



Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y BIOCENCIAS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARITZAKO ETA
BIOZIENTZIETAKO GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKO***

***EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES TECNOLÓGICAS Y
FISICOQUÍMICAS DE FILMS ALIMENTARIOS DE QUITOSANO CON
NANOPARTÍCULAS DE QUITINA Y CARVACROL***

presentado por

SARA SÁNCHEZ FALCES

GRADO EN INNOVACIÓN DE PROCESOS Y PRODUCTOS ALIMENTARIOS

Junio, 2021

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE
INGENIERÍA AGRONÓMICA Y
BIOCIENCIAS**

**NEKAZARITZAKO INGENIARITZAKO ETA
BIOCIENCIAS BIOZIENTZIETAKO GOI
MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA**

**UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y
BIOCIENCIAS**

**TRABAJO FIN DE GRADO DEL GRADO EN INNOVACIÓN DE PROCESOS Y
PRODUCTOS ALIMENTARIOS**

**Evaluación de las propiedades tecnológicas y fisicoquímicas de films alimentarios
de quitosano con nanopartículas de quitina y carvacrol**

Trabajo Fin de Grado presentado por **Sara Sánchez Falces** con el objetivo de optar al título de Grado en Innovación de Procesos y Productos Alimentarios siendo sus directores la Dra. Carmen Barba González-Albo y el Dr. Juan Ignacio Maté Caballero, del Departamento de Agronomía, Biotecnología y Alimentación de la Universidad Pública de Navarra.

La directora del Trabajo

El director del Trabajo

La estudiante

Dra. Carmen Barba González-Albo

Dr. Juan Maté Caballero

Sara Sánchez Falces

Pamplona, junio de 2021

RESUMEN

El empleo de nanopartículas en films alimentarios elaborados con biopolímeros (hidrocoloides) es especialmente interesante para mejorar las propiedades físicoquímicas, mecánicas y de barrera. Las nanoestructuras incorporadas en films permiten también la regulación de la liberación de los compuestos incorporados en las matrices poliméricas.

El objetivo del trabajo fin de grado fue (todo en pasado) el desarrollo de un protocolo de elaboración de films de quitosano con nanopartículas de quitina y el compuesto activo carvacrol. Se elaboraron films con una concentración de carvacrol (1% w/w respecto cantidad de quitosano) y dos concentraciones de nanoquitina (1,5% y 3% w/w respecto cantidad de quitosano). Fueron evaluadas las propiedades físicoquímicas (contenido de humedad, espesor, opacidad, color) como tecnológicas (permeabilidad al vapor de agua y mecánicas) de los films elaborados. Por otro lado, se estudió la estabilidad de la solución formadora de films.

Con la adición de las nanopartículas de quitina se obtiene un aumento de la opacidad y menor contenido de humedad en los films. Con estas formulaciones se consigue que los valores de permeabilidad al vapor de agua disminuyan, así como los de tensión máxima de rotura y aumenten los de elongación de rotura.

En cuanto a las formulaciones que contienen también carvacrol, se da un aumento en los valores de la humedad, así como en los valores de la tensión máxima.

Este trabajo fin de grado pretende avanzar en el conocimiento de biofilms alimentarios para desarrollar materiales de envasado respetuosos con el medioambiente y que supongan una alternativa a los materiales plásticos tradicionales.

Palabra clave: quitosano, nanopartículas, quitina, carvacrol, film.

SUMMARY

The use of nanoparticles in food films made with biopolymers (hydrocolloids) is especially interesting to improve the physical-chemical, mechanical, and barrier properties. The nanostructures incorporated in films also allow the regulation of the release of the compounds incorporated in the polymeric matrices.

The objective of the final degree project was the development of a protocol for the elaboration of chitosan films with chitin nanoparticles and the active compound carvacrol. Films were made with a concentration of carvacrol (1% w / w with respect to the amount of chitosan) and two concentrations of nanochitin (1,5% and 3% w / with respect to the amount of chitosan). The physicochemical (moisture content, thickness, opacity, color) and technological properties (water vapor permeability and mechanical) of produced films were evaluated. On the other hand, the stability of the film-forming solution was also studied.

With the addition of chitin nanoparticles, an increase in opacity and a reduction moisture content in the films was obtained. With these formulations, water vapor permeability and tensile strength decreased while elongation at break increased.

Formulations with carvacrol were found to have higher values of humidity values and tensile strength.

This final degree project aims to advance the knowledge of food biofilms to develop packaging materials that are respectful with the environment and represent an alternative to traditional plastic materials.

Keywords: chitosan, nanoparticles, chitin, carvacrol, film.

Índice

1.	Introducción.....	1
1.1.	Nanotecnología.....	1
1.1.1.	Nanotecnología en el sector agroalimentario	1
1.1.2.	Nanocompuestos y el envasado alimentario	1
1.2.	Qué son la quitina y el quitosano	3
1.2.1.	Obtención de la quitina y quitosano	4
1.2.2.	Características del quitosano	4
1.3.	Películas biodegradables	5
1.3.1.	Hidrocoloides	5
1.3.2.	Lípidos.....	6
1.3.3.	Compuestos	7
1.4.	Propiedades fisicoquímicas	7
1.4.1.	Contenido de humedad.....	7
1.4.2.	Transparencia	8
1.4.3.	Estabilidad de la solución formadora de films	8
1.5.	Propiedades mecánicas.....	9
1.6.	Propiedades de barrera	9
1.6.1.	Permeabilidad al vapor de agua.....	9
1.6.2.	Permeabilidad a lípidos	9
1.6.3.	Permeabilidad a gases	10
2.	Objetivos.....	10
3.	Diseño experimental, materiales y método	11
3.1.	Diseño experimental.....	11
3.2.	Materiales utilizados	11
3.2.1.	Componentes base.....	11
3.2.2.	Materiales auxiliares	12
3.3.	Métodos.....	13
3.3.1.	Preparación de las películas	13
3.3.2.	Caracterización de las propiedades fisicoquímicas	15
3.3.3.	Caracterización de las propiedades tecnológicas	18
3.3.4.	Análisis estadístico	20
4.	Resultados.....	20
4.1.	Apariencia y estabilidad de las soluciones formadoras de films	20
4.2.	Apariencia de los films.....	23
4.4.	Opacidad	25
4.5.	Color.....	25

4.6.	Contenido de humedad.....	26
4.7.	Permeabilidad al vapor de agua.....	27
4.8.	Propiedades mecánicas.....	28
5.	Conclusiones.....	29
6.	Bibliografía.....	31
7.	Apéndice.....	34
7.1.	ANEXO I - Ficha técnica quitosano	34
7.2.	ANEXO II - Ficha técnica glicerol.....	35
7.3.	ANEXO III - Ficha técnica carvacrol.....	36
7.4.	ANEXO IV - Opacidad.....	37
7.5.	ANEXO V - Contenido en humedad.....	38
7.6.	ANEXO VI - Propiedades de barrera.....	40
7.7.	ANEXO VII - Propiedades mecánicas.....	41

Índice de figuras

FIGURA 1.	DEFINICIÓN GEOMÉTRICA DE LOS NANORELLENOS. (A) NANOPARTÍCULA, (B) NANOVARILLA, (C) NANOPLAQUETA, (D-F) FORMA AGREGADA DE CADA NANO-RELLENO	2
FIGURA 2.	ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA QUITINA (A) Y DEL QUITOSANO (B) (KHAYROVA ET AL., 2021).....	4
FIGURA 3.	ESTRUCTURA QUÍMICA DEL CARVACROL	7
FIGURA 4.	QUITOSANO EMPLEADO EN LA ELABORACIÓN DE LAS PELÍCULAS	12
FIGURA 5.	NANOPARTÍCULAS DE QUITINA EMPLEADAS EN LA ELABORACIÓN DE PELÍCULAS	12
FIGURA 6.	ULTRASONIDOS HIELSCHER UP400S.....	13
FIGURA 7.	SOLUCIONES FORMADORAS DE FILMS EN AGITACIÓN	14
FIGURA 8.	DISPOSICIÓN DE LAS PLACAS EN LA CÁMARA CLIMÁTICA	14
FIGURA 9.	MICRÓMETRO DIGITAL (ID-F125, MITUTOYO CORP., TOKIO, JAPÓN).....	15
FIGURA 10.	ESPECTROFOTÓMETRO (UH5300, HITACHI, JAPÓN)	16
FIGURA 11.	COLORÍMETRO, MINOLTA CM 2500D	17
FIGURA 12.	TURBISCAN, LLENADO DEL VIAL DE MANERA CORRECTA E INTRODUCCIÓN DE ESTE.....	17
FIGURA 13.	TEXTURÓMETRO TEXTURE ANALYZER TA-XTZi7	18
FIGURA 14.	MONTAJE DE LAS CÉLULAS DE METACRILATO (IZQ) Y CABINA SANPLATEC (DCHA).....	19
FIGURA 15.	CÉLULAS DE METACRILATO EMPLEADAS EN EL ENSAYO Y ESQUEMA DEL SISTEMA QUE SE CREA	19
FIGURA 16.	APARIENCIA DE LAS DIFERENTES SOLUCIONES FORMADORAS DE FILMS. QUITOSANO (A), 1,5% NWQ (B), 3%NWQ (C), 1% CARVACROL (D), 1% CARVACROL+1,5%NWQ (E), 1%CARVACROL+3%NWQ.....	21
FIGURA 17.	REPRESENTACIÓN DE ΔBS EN FUNCIÓN DE LA ALTURA DEL VIAL PARA IDENTIFICAR LA DESESTABILIZACIÓN DE LA MUESTRA. QUITOSANO (A), 1% CARVACROL (B).....	21
FIGURA 18.	REPRESENTACIÓN DE ΔBS EN FUNCIÓN DE LA ALTURA DEL VIAL PARA IDENTIFICAR LA DESESTABILIZACIÓN DE LA MUESTRA. 1,5% NWQ (A), 1% CARVACROL + 1,5% NWQ (B).....	22
FIGURA 19.	REPRESENTACIÓN DE ΔBS EN FUNCIÓN DE LA ALTURA DEL VIAL PARA IDENTIFICAR LA DESESTABILIZACIÓN DE LA MUESTRA. 3% NWQ (A), 1% CARVACROL + 3% NWQ (B).....	22
FIGURA 20.	ÍNDICE DE ESTABILIDAD DE LAS SOLUCIONES FORMADORAS DE FILMS ESPECÍFICO DEL EQUIPO (TSI)	23
FIGURA 21.	APARIENCIA DE LAS DIFERENTES PELÍCULAS UNA VEZ DESPEGADAS. QUITOSANO (A), 1,5% NWQ (B), 3%NWQ (C), 1% CARVACROL (D), 1% CARVACROL+1,5%NWQ (E), 1%CARVACROL+3%NWQ (F).....	24

FIGURA 22. MICROESTRUCTURAS DE SECCIÓN TRANSVERSAL DE PELÍCULAS BASADAS EN QUITOSANO. IMÁGENES FACILITADAS POR EL SERVICIO DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA	24
FIGURA 23. VALORES MEDIOS DE OPACIDAD EN LAS DISTINTAS FORMULACIONES A DÍA CERO Y DESPUÉS DE 7 DÍAS A TEMPERATURA AMBIENTE. LAS LETRAS EN MINÚSCULAS IGUALES INDICAN QUE NO HUBO DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS EN SOLUCIONES A DÍA CERO ($P>0,05$).....	25
FIGURA 24. VALORES MEDIOS DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DE LAS DISTINTAS FORMULACIONES, LAS LETRAS IGUALES INDICAN QUE NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($P>0,05$)	26
FIGURA 25. PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (WVP), LAS LETRAS IGUALES EN MINÚSCULAS INDICAN QUE NO HUBO DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($P>0,05$).....	27
FIGURA 26. VALORES MEDIOS DE TENSIÓN MÁXIMA, LAS LETRAS IGUALES EN MINÚSCULAS INDICAN QUE NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($P>0,05$)	28
FIGURA 27. VALORES MEDIOS DE ELONGACIÓN RELATIVA DE ROTURA, LETRAS IGUALES EN MINÚSCULAS INDICA QUE NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($P>0,05$)	29
FIGURA 28. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL ENSAYO DE TRACCIÓN DE LA FORMULACIÓN DE QUITOSANO	48
FIGURA 29. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL ENSAYO DE TRACCIÓN DE LA FORMULACIÓN DE QUITOSANO + 1,5% NWQ.....	49
FIGURA 30. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL ENSAYO DE TRACCIÓN DE LA FORMULACIÓN DE QUITOSANO + 3% NWQ	50
FIGURA 31. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL ENSAYO DE TRACCIÓN DE LA FORMULACIÓN DE QUITOSANO + CARVACROL.....	51
FIGURA 32. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL ENSAYO DE TRACCIÓN DE LA FORMULACIÓN DE QUITOSANO + 1,5% NWQ + CARVACROL.....	52
FIGURA 33. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL ENSAYO DE TRACCIÓN DE LA FORMULACIÓN DE QUITOSANO + 3% NWQ + CARVACROL.....	53

Índice de tablas

TABLA 1. PORCENTAJE DE CONTENIDO DE QUITINA EN PESO SECO DE DIFERENTES FUENTES DE ESTA (SYNOWIECKI & AL-KHATEEB, 2003; WILLIAMS ET AL., 2016).....	3
TABLA 2. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LAS PELÍCULAS BIODEGRADABLES.....	11
TABLA 3. PARÁMETROS DEL QUITOSANO UTILIZADO	11
TABLA 4. DIFERENTES PARÁMETROS DEL CARVACROL UTILIZADO	12
TABLA 5. CANTIDAD DE COMPONENTES EN LA ELABORACIÓN DE LAS PELÍCULAS DE QUITOSANO	14
TABLA 6. CANTIDAD DE COMPONENTES EN LA ELABORACIÓN DE LAS PELÍCULAS DE QUITOSANO Y NANOPARTÍCULAS DE QUITINA	15
TABLA 7. CANTIDAD DE COMPONENTES EN LA ELABORACIÓN DE LAS PELÍCULAS DE QUITOSANO, NANOPARTÍCULAS DE QUITINA Y CARVACROL.....	15
TABLA 8. PARÁMETROS DE COLOR PARA LAS DIFERENTES PELÍCULAS, $\Delta E1$ CORRESPONDE A LAS COMPARACIONES ENTRE LAS DIFERENTES FORMULACIONES Y EL CONTROL 1 (QUITOSANO), $\Delta E2$ CORRESPONDE A LAS COMPARACIONES ENTRE LAS DIFERENTES FORMULACIONES Y EL CONTROL 2 (QUITOSANO + CARVACROL)	26
TABLA 9. DATOS DE OPACIDAD PARA TODOS LOS FILMS ELABORADOS	37
TABLA 10. DATOS DE LOS PESOS INICIALES Y FINALES (G) DE TODOS LOS FILMS ELABORADOS	38
TABLA 11. RESULTADOS OBTENIDOS DE LA PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA DE LAS DISTINTAS FORMULACIONES	40
TABLA 12. DATOS MEDIOS DEL ESPESOR, PESO, SECCIÓN, ÁREA Y GRAMAJE DE LAS DISTINTAS FORMULACIONES	41
TABLA 13. PROPIEDADES MECÁNICAS PARA LA FORMULACIÓN DE QUITOSANO	42
TABLA 14. PROPIEDADES MECÁNICAS PARA LA FORMULACIÓN DE QUITOSANO + 1,5% NWQ.....	43
TABLA 15. PROPIEDADES MECÁNICAS PARA LA FORMULACIÓN DE QUITOSANO + 3% NWQ	44
TABLA 16. PROPIEDADES MECÁNICAS PARA LA FORMULACIÓN DE QUITOSANO + CARVACROL	45
TABLA 17. PROPIEDADES MECÁNICAS PARA LA FORMULACIÓN DE QUITOSANO + 1,5% NWQ + CARVACROL	46
TABLA 18. PROPIEDADES MECÁNICAS PARA LA FORMULACIÓN DE QUITOSANO + 3% NWQ + CARVACROL	47

1. Introducción

1.1. Nanotecnología

La nanotecnología engloba los procesos de caracterización, preparación y/o influencia de estructuras de materiales con, por lo menos, una dimensión de, aproximadamente, 1-100 nm de longitud. Cuando el tamaño de las partículas se reduce por debajo de este rango el material resultante presenta propiedades fisicoquímicas diferentes a las propiedades de los materiales de los que provienen (Youssef & El-Sayed, 2018)

1.1.1. Nanotecnología en el sector agroalimentario

La aplicación de la nanotecnología en la industria agroalimentaria se trató por primera vez en el Departamento de Agricultura de EEUU (USDA) en septiembre de 2003. Desde entonces ha tenido un gran avance en diferentes áreas como en los envasados (envases activos y envases para ingredientes), desarrollo de nuevos productos (nanoalimentos funcionales y microcápsulas), calidad y seguridad alimentaria (biosensores) y en la mejora de los procesos de los alimentos (gelatinización, espumas y emulsiones) (Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2012).

- Agricultura, la nanotecnología ha supuesto una revolución en las prácticas agrícolas mejorando las técnicas convencionales. El uso de estas técnicas tiene la finalidad de dirigir la agricultura hacia una mayor sostenibilidad consiguiendo maximizar la producción y minimizar el uso de químicos. En este campo se han de destacar los nanopesticidas y los nanogeles. Con este último se ha conseguido el control de la mosca de la fruta (Pardo de Santayana de Pablo, 2018).
- Ganadería, en el sector ganadero se ha estudiado la encapsulación de diferentes nutrientes para su uso veterinario pudiendo llegar a reemplazar el uso de antibióticos en el control de bacterias y toxinas de los piensos (Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2012).
- Alimentación, a largo plazo se prevé que la nanotecnología sea empleada en este campo enfocada a la liberación controlada de ingredientes alimentarios o nutrientes encapsulados. La incorporación de la nano-encapsulación puede proteger a los nutrientes que contengan de la degradación mejorando su estabilidad y solubilidad (Fúnez et al., 2016).
- Envasado alimentario, el uso de la nanotecnología en este campo permite que se desarrollen nuevos materiales con propiedades antimicrobianas, películas reforzadas mecánicamente, barreras a gases... Todo esto permite que se puedan desarrollar barreras con un menor espesor y peso manteniendo o mejorando sus propiedades (Fúnez et al., 2016).

1.1.2. Nanocompuestos y el envasado alimentario

Los nanorrellenos han sido objeto de numerosas investigaciones para conocer cómo afecta la adición de estas en la matriz polimérica y, cuando los nanorellenos, se dispersan en la matriz mejoran las propiedades funcionales. Con la adición de nanorrellenos se consigue que el comportamiento mecánico mejore a medida que la homogeneidad de la disolución aumenta, también se mejora la permeabilidad a los gases debido a que se da un aumento de la tortuosidad (George & Ishida, 2018).

Actualmente los nanorelentos están regulados por el Reglamento (UE) 2015/2283 en el que se indica que, un nanomaterial artificial, es cualquier material producido intencionadamente que tenga una o más dimensiones del orden de los 100 nm o menos o que esté compuesto de partes funcionales diferenciadas, internamente o en superficie, muchas de las cuales tengan una o más dimensiones del orden de 100 nm o menos, incluidas estructuras, aglomerados o agregados, que podrán tener un tamaño superior a los 100 nm pero conservando propiedades que sean características de la nanoescala. Según esta definición cualquier envasado que contenga algún elemento de este tipo deberá estar señalado con la palabra ‘nano’ detrás del componente.

Estos nanorrelenos pueden tener diferentes formas como pueden ser ‘nanopartículas’, ‘nanovarillas’ y ‘nanoplaquetas’ como se puede observar en la **Figura 1**. Dependiendo de la forma del nanorreleno tendrá un efecto determinado en la matriz polimérica (George & Ishida, 2018).

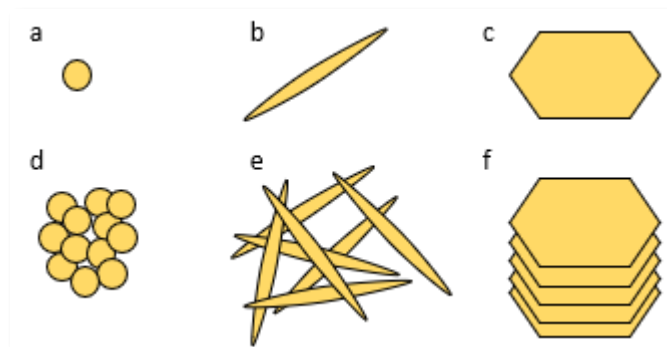


Figura 1. Definición geométrica de los nanorrelenos. (a) nanopartícula, (b) nanovarilla, (c) nanoplaqueta, (d-f) forma agregada de cada nano-relleno

Hay diferentes tipos de nanorrelenos que se pueden utilizar en las matrices de los biopolímeros y se pueden agrupar en nanoestructuras inorgánicas, orgánicas y de carbono.

- 1) **Nanorrelenos inorgánicos:** dentro de este grupo se encuentran, por ejemplo, las nanopartículas de cobre o de plata. Estas últimas están ganando cada vez más atención en el campo de la medicina y del envasado alimentario, puesto que muestran propiedades biológicas únicas como una gran estabilidad microbiana y capacidad de aceleración de la cicatrización. De la misma manera se pudo observar como la incorporación de estas nanopartículas en una matriz a base de quitosano mejoraron los valores de permeabilidad al vapor de agua (Kadam *et al* 2019).
- 2) **Nanorrelenos orgánicos:** dentro de este grupo, uno de los materiales más utilizados son las arcillas naturales debido a su bajo coste, versatilidad y gran disponibilidad. Las nanoarcillas más utilizadas es la montmorillonita (MMT) y la halloysita (Hal). Las nanopartículas de quitina y quitosano han ido ganando atención en su uso como nanorrelenos debido a su biocompatibilidad, no toxicidad, capacidad de formación de película y su actividad antimicrobiana (George & Ishida, 2018).
- 3) **Nanorrelenos de carbono:** los materiales a base de grafeno han ido captando mayor atención puesto que poseen unas excelentes propiedades mecánicas y excelente conductividad eléctrica y térmica. El foco de estos nanocomponentes está en el óxido de grafeno cuyas láminas resultantes son solubles en agua (George & Ishida, 2018).

1.1.2.1. Nanopartículas de quitina

Las nanopartículas de quitina parten de este polímero cristalino que tiene tres formas, α (alfa), β (beta) y γ (gamma). Las cadenas de quitina suelen estar conectadas por enlaces de hidrógenos y por fuerzas de Van de Waals creando microfibrillas. Las microfibrillas están compuestas por nanofibrillas en una matriz de proteínas, esto podría indicar que la quitina es un buen candidato para la formación de nanofibras, sin embargo, esto tiene gran dificultad debido a los enlaces de hidrógeno que unen estas fibrillas (Lu *et al* 2013).

Para conseguir obtener las nanofibras se debe someter a la quitina a condiciones de altas presiones y tratamientos mecánicos para, en un primer paso, conseguir aislar las nanofibras y, a continuación, proceder al aislamiento de nanocristales con la utilización de medios ácidos (Salaberria *et al* 2015).

Partiendo de estos compuestos se han realizado numerosos estudios para comprobar qué efecto tienen las nanopartículas de quitina sobre las propiedades de las películas resultantes. Se observó que las propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua mejoraron (Ifuku *et al* 2013; Salaberria *et al* 2015; Wu *et al* 2019).

1.2. Qué son la quitina y el quitosano

La quitina es el segundo suministro más grande de biopolímeros naturales debido a que se encuentran presentes en hongos, algas e insectos, aunque la mayor cantidad se encuentra en los exoesqueletos de crustáceos tal y como aparece representado en la **Tabla 1**. Debido a que la industria alimentaria de productos marinos genera gran cantidad de residuos, provocando un problema medioambiental puesto que tienen una lenta descomposición. Estos desechos contienen hasta un 35% de quitina se podría solucionar este problema reutilizando estos desechos para la obtención de quitina (Escobar Sierra *et al* 2013).

Tabla 1. Porcentaje de contenido de quitina en peso seco de diferentes fuentes de esta (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003; Williams *et al.*, 2016)

Fuente			Contenido en quitina (%)
Crustáceos	Cangrejo	<i>Collinectes sapidus</i>	13,5
		<i>Chionoecetes opilio</i>	26,6
	Camarón	<i>Pandalus borealis</i>	17,0
		<i>Penaeus monodon</i>	40,4
	Krill	<i>Euphausia superba</i>	24,0
Hongos	<i>Aspergillus niger</i>		42,0
	<i>Penicilium chrysogenum</i>		19,5-42,0
	<i>Mucor rouxii</i>		9,4
	<i>Saccharomyces gutulata</i>		2,3
Insectos	Grillos juveniles		9,6
	Adultos de grillos		10,2
	Larvas gusano de la harina		6,6
	Adulto gusano de la harina		20,4

La quitina es un compuesto insoluble en agua y en disolventes orgánicos, tiene un alto peso molecular y, como aparece en la **Figura 2** está compuesto por unidades de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos β (1 \rightarrow 4) de manera que forma una cadena lineal. Este compuesto es capaz de formar tres tipos de estructuras cristalinas

dependiendo del número de cadenas por células, el grado de hidratación y el tamaño de la unidad. Los tipos de estructuras que se encuentran son α , β y γ . La α -quitina es la que se encuentra de manera más abundante (Santos *et al* 2020).

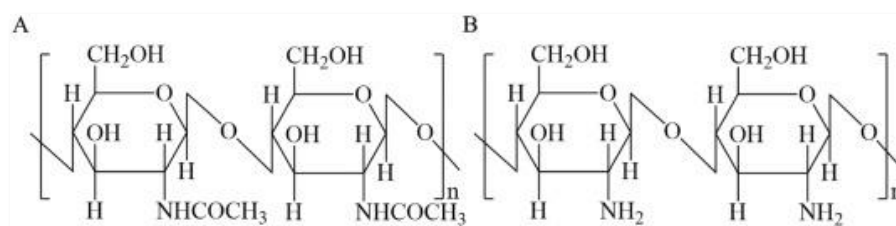


Figura 2. Estructura química de la quitina (A) y del quitosano (B) (Khayrova *et al.*, 2021)

El quitosano es un derivado de la quitina constituido por unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glicopranosa unidas mediante enlaces glucosídicos β ($1 \rightarrow 4$). Para que sea considerado como quitosano ha de tener un grado de desacetilación del 50% como mínimo. El porcentaje de desacetilación generará diferentes características estructurales que, como consecuencia, estarán determinando las propiedades fisicoquímicas y biológicas del polímero resultante de su uso (Santos *et al* 2020).

1.2.1. Obtención de la quitina y quitosano

Para la extracción de la quitina y posterior obtención del quitosano se debe partir del caparazón de crustáceos. Para esto los protocolos de extracción han de tener, como mínimo, cuatro etapas:

- 1) Preparación de la materia prima: se parte de los caparazones de diferentes crustáceos recolectados en las industrias de procesados de productos marinos y de desechos de diferentes restaurantes. En esta etapa se ha de lavar los desechos, con agua potable, para conseguir retirar la materia orgánica que pueda estar adherida. Finalmente se seca para quitar el exceso de agua y se tritura y tamiza (Escobar Sierra *et al* 2013).
- 2) Desproteínización: las proteínas que pueda haber en la muestra se extraen mediante el tratamiento de la muestra con una solución de hidróxido de sodio (NaOH). A continuación, se filtra al vacío y se neutraliza con agua desionizada.
- 3) Desmineralización: se remueven los carbonatos de calcio mediante el uso del cloruro de hidrógeno (HCl). Dependiendo de la especie pesquera de la cual se obtenga la materia prima se deben de adoptar diferentes métodos de extracción debido a que los minerales no se encuentran en la misma proporción (Kumari *et al* 2015).
- 4) Desacetilación: en este proceso se obtiene el quitosano como derivado de la quitina mediante hidrólisis alcalina y posterior tratamiento con soluciones ácidas (Santos *et al* 2020). Los grupos amino que se encuentran en la quitina están de forma acetilada y, dependiendo del origen de esta, tendrá más o menos grupos N-acetilo. En el quitosano el contenido de N-acetilo depende también de las condiciones de desacetilación y, así mismo, de la fuente de quitina (Kurita, 2006).

1.2.2. Características del quitosano

El quitosano se deriva de la quitina por desacetilación en un medio alcalino y se describe en términos de grados de desacetilación y peso molecular. Su importancia reside en las propiedades antimicrobianas, biodegradables, no tóxicas y propiedades formadoras de películas ya que las películas resultantes poseen buenas propiedades mecánicas y

permeabilidad selectiva a los gases (J. Liu *et al* 2017). Sin embargo, las películas a base de este material son altamente permeables al vapor de agua lo que limita su uso puesto que el control de transferencia de humedad es importante en la mayoría de los alimentos. Para conseguir mejorar la permeabilidad al vapor de agua se añaden elementos que aumenten la hidrofobicidad como lípidos, ceras o nanopartículas. Al incluir estos elementos en la matriz de la disolución suelen dar como resultado películas un empeoramiento de las propiedades mecánicas (Elsabee & Abdou, 2013).

El quitosano presenta la característica de solubilidad en soluciones ácidas debido a que los grupos amino libres están protonados, es decir, se encuentran como ion amonio (NH_3^+). Conforme el pH se acerca a 6 la tendencia de precipitación aumenta debido a que aumenta la cantidad de $-\text{NH}_2$. Los grupos aminos presentes en este compuesto permiten que este se una a materiales que tienen una carga negativa como otros polisacáridos. Que el quitosano sea objeto de estudio se debe a que tiene gran cantidad de propiedades interesantes como es su insolubilidad en agua, su carga positiva a un pH biológico (cerca de 7,4) y su facilidad para formar geles (Santos *et al* 2020).

1.3. Películas biodegradables

Con el propósito de reducir diversos problemas medioambientales, entre los que se encuentran los microplásticos, se han valorado diferentes materiales como posibles alternativas a estos. Este intento de buscar alternativas a los plásticos se debe a que estos están basados en recursos fósiles los cuales no son biodegradables, es decir, no son capaces de descomponerse en elementos químicos naturales por acción de agentes biológicos. En respuesta a esto, aparecieron los ‘plásticos biodegradables’ asociados al uso de materias primas renovables, macromoléculas sintetizadas a partir de monómeros naturales o idénticos a estos. La principal característica de estos es que no aportan elementos tóxicos al suelo, aguas o seres vivos. Los materiales biodegradables también presentan una serie de restricciones a tener en cuenta y es que estos envases tienen que conseguir ser una buena barrera frente a la humedad debido a que la mayor parte de los materiales utilizados en su producción tienen naturaleza hidrofílica.

Las películas biodegradables siguen siendo en la actualidad objeto de investigación debido a la gran cantidad de posibilidades que ofrecen. En estas se busca igualar a sus análogas sintéticas en cuanto a su resistencia mecánica, elasticidad y flexibilidad y a su propiedad como barrera a humedad, gases y aromas. Esto se consigue con diferentes variaciones en la composición (polisacáridos, lípidos, proteínas o combinaciones). Por lo tanto, se puede concluir que las propiedades de las películas dependerán del polímero que sea utilizado como matriz puesto que dependiendo de la polaridad de los componentes que se formen darán como resultado unas u otras, por ello se recoge a continuación un pequeño resumen de los polímeros más utilizados para la síntesis de películas:

1.3.1. Hidrocoloides

Las películas realizadas a base de polisacáridos, normalmente, tienen malas propiedades como barrera al agua, aunque sí que presentan una permeabilidad selectiva en cuanto al dióxido de carbono, oxígeno y control de migración de lípidos (Tran *et al* 2020).

Dentro de este grupo se encuentran los carbohidratos y las proteínas.

➤ Carbohidratos:

- Almidón: ha sido utilizado para la realización de envases biodegradables durante décadas debido a sus características y su capacidad de gelatinización.
- Alginato: es otro polímero muy utilizado debido a que tiene la capacidad de crear hidrogeles. El alginato es obtenido principalmente de *Macrocystis pyrifera*.
- Agar: es obtenido, en su mayoría, de algas rojas y tiene una gran capacidad gelificante dando como resultado films con buenas propiedades mecánicas y, en comparación con otros hidrocoloides, mejora las propiedades de barrera al vapor de agua.
- Quitosano: es obtenido por desacetilación de la quitina, componente principal del exoesqueleto de crustáceos. En la actualidad ha atraído la atención en la elaboración de películas puesto que es un excelente formador de películas debido a que podría formar enlaces de hidrógeno e interacciones hidrófobas (Díaz-Montes & Castro-Muñoz, 2021). Presenta buena barrera frente al oxígeno y al dióxido de carbono.

➤ **Proteínas:**

Las proteínas usadas en la formulación de películas biodegradables pueden ser tanto de origen animal (caseína y colágeno) como vegetal (zeína y gluten de trigo).

- Caseína: es una proteína que se encuentra con facilidad en la naturaleza debido a que es la proteína más abundante en la leche procedente de mamíferos. Los caseinatos son capaces de formar películas en soluciones acuosas dando como resultado películas transparentes y flexibles.
- Colágeno: se encuentra de forma natural en los tejidos animales como son tendones, piel y huesos. Las películas formadas con colágeno han sido estudiadas como recubrimiento para productos cárnicos puesto que es una buena barrera frente a oxidación.
- Zeína: tiene su origen de aislados de proteína de maíz y, a partir de esta, se desarrollan soluciones alcohólicas dando lugar a películas con buenas características de permeabilidad al vapor de agua y buenas propiedades mecánicas. Hay que destacar que también tiene buenas características frente al termosellado.
- Gluten de trigo: este ha sido utilizado como reemplazo del colágeno.

1.3.2. Lípidos

Generalmente las películas que contienen componentes lipídicos son combinadas con base hidrocoloide debido a que por si solas no tienen la integridad estructural para formar películas. La incorporación de lípidos consigue reducir notablemente la permeabilidad al vapor de agua de las películas puesto que actúan como obstáculo ante la transferencia de agua (Yousuf *et al* 2021). Algunos de los materiales de esta naturaleza son:

- Cera de abeja.
- Aceite de girasol.
- Aceite esencial de clavo.
- Aceite esencial de orégano.

1.3.2.1. Carvacrol: obtención y características

Los aceites esenciales son mezclas de compuestos químicos sintetizados por plantas como terpenos, alcoholes o cetonas. Debido a sus propiedades antimicrobianas los aceites esenciales han sido utilizados para enriquecer películas y recubrimientos comestibles (Otero-Tuárez *et al* 2019).

El carvacrol es un fenol monoterpeno, como aparece en la **Figura 3**, que se encuentra en los aceites esenciales de orégano y tomillo. Este compuesto tiene un gran interés puesto que presenta actividad antimicrobiana para numerosos patógenos alimentarios y bacterias que causan descomposición en los alimentos (F. Liu *et al* 2021). Esto sumado a su baja toxicidad y agradable sabor y olor sugieren su uso como aditivo alimentario frente a la contaminación microbiana.

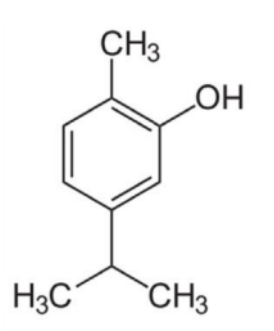


Figura 3. estructura química del carvacrol

La obtención de este compuesto se puede extraer mediante hidrodestilación con trampa de Clevenger. Se toman hojas de orégano en fresco (*Oreganum vulgare*) y se dejan secar (Téllez *et al* 2014). La hidrodestilación consiste en calentar la materia prima junto con agua de manera que el aceite esencial se libera y se evapora para, finalmente, gracias al condensador obtenerse un extracto líquido.

1.3.3. Compuestos

Los films compuestos son películas que contienen mezcla, por lo general suelen estar formados por hidrocoloides y lípidos. Esta combinación se realiza para poder combinar las ventajas de ambos polímeros para conseguir disminuir la permeabilidad al vapor de agua. Estos films se pueden obtener de dos maneras:

- Laminados: son films conseguidos por capas superpuestas, lo que se consigue normalmente son bicapas con la parte lipídica sobre el hidrocoloide.
- Conglomerados: estos están basados en una mezcla heterogénea de las partículas lipídicas hidrófobas en la matriz hidrofílica de los hidrocoloides. Esto se consigue mediante una emulsión o microemulsión.

1.4. Propiedades fisicoquímicas

1.4.1. Contenido de humedad

El contenido de **humedad** que presentan las películas es un parámetro que se ha de tener en cuenta puesto que influye en las propiedades finales del film. Esto es importante porque un mayor contenido en humedad supone una mejora en las propiedades mecánicas y una mayor permeabilidad al agua.

1.4.2. Transparencia

La **transparencia** es un aspecto a tener en cuenta puesto que, junto con el color, pueden determinar la decisión de los compradores a elegir un producto u otro. Dependiendo del producto que se quiera preservar se utiliza un envase u otro, por ejemplo, si el producto se degrada con el impacto de la luz se utilizará un envase más opaco como en el caso de la cerveza.

Para medir la transparencia se utiliza un espectrofotómetro y se registra la absorbancia a una longitud de onda determinada. En el caso del color, este es medido con un colorímetro.

1.4.3. Estabilidad de la solución formadora de films

Una solución formadora de films es una dispersión coloidal de un líquido en el seno de otro. La emulsión es físicamente estable cuando el número, distribución de tamaños y disposición espacial de las gotas de la fase dispersa cambia de forma imperceptible sensorialmente con el tiempo de almacenamiento, esta estabilidad se puede perder debido a:

- a) El tamaño y densidad de las partículas provocan su separación causando un aumento del tamaño de las ‘gotas’ y, finalmente, la separación de las fases.
- b) Choque entre las partículas produciendo su unión y aumento de tamaño hasta que al final se acaban separando las dos fases.

La estabilidad de las emulsiones se puede controlar bien controlando la velocidad de sedimentación o bien controlando la floculación/coalescencia. En el primer caso, control de la velocidad de sedimentación se controla el tamaño de partícula de la fase dispersa o la viscosidad de la fase continua. En el caso de controlar la floculación/coalescencia interesa examinar la tensión superficial de la interfase, carga iónica superficial de la fase dispersa y fuerza iónica de la fase continúa.

Para esto se deben comprender una serie de conceptos:

- **Tensión superficial:** en la superficie las moléculas forman menos puentes de hidrógeno y se forma una capa resistente, cuanto menor sea esta tensión superficial mayor será la estabilidad de la emulsión y menor el trabajo necesario para formarla.
- **Tamaño de la partícula:** cuanto menor sea el tamaño de las partículas mayor será el tiempo en el que se produzcan la separación entre las fases.
- **Viscosidad:** un aumento en la viscosidad de la fase continua (acuosa) se consigue mediante la adición de hidrocoloides o espesantes.
- **Estabilidad mediante carga iónica:** esta carga evita, por ejemplo, el acercamiento de gotas de aceite debido a la carga superficial de la cabeza polar del surfactante. Se puede dar que, si la fuerza iónica es demasiado elevada, las fuerzas de atracción superan a las fuerzas de repulsión.

Esta estabilidad se puede evaluar de diferentes formas, una de ellas es mediante la utilización del Turbiscan. Este es un equipo que utiliza la técnica de dispersión múltiple de luz (MLS) para cuantificar la desestabilización de la dispersión a lo largo del tiempo. Así pues, con este método se realizan escaneos periódicos de manera que el software representa la señal gráficamente colocando la altura del vial introducido en el eje X y la intensidad de la señal en el eje Y.

1.5. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas vienen determinadas en gran medida por los materiales utilizados en su elaboración y, sobre todo, en la capacidad de los polímeros utilizados para formar enlaces entre las diferentes cadenas poliméricas y la estabilidad de estos (Garde Izquierdo, 2014).

En el estudio de las propiedades mecánicas se estudian los siguientes parámetros (Marzo Rojas, 2010):

1. Tensión máxima (σ_{\max}): se corresponde a la máxima tensión que la película es capaz de soportar a lo largo del ensayo de tracción.
2. Elongación relativa: porcentaje que indica cuánto ha cambiado la longitud de la película hasta su rotura.
3. Módulo de Young: mide la rigidez de la película y es el cociente entre la tensión y la elongación de la región elástica.

1.6. Propiedades de barrera

1.6.1. Permeabilidad al vapor de agua

La **permeabilidad al vapor de agua** (Water Vapor Permeability, WVP) es una medida que indica la facilidad con la que un material puede ser traspasado por el vapor de agua. La permeabilidad consiste en el proceso de solución y difusión donde el permeante se disuelve en una cara del material, difunde a través de él hacia el otro lado debido al gradiente de concentración y, entonces, se desorbe por evaporación.

Este proceso de difusión a través de la película depende del tamaño, forma y polaridad de la molécula que difunde, así como de la naturaleza, estructura y características del polímero con el que se ha realizado.

Las películas que están basadas en compuestos con naturaleza hidrofóbica son los que más eficacia presentan retardando el intercambio de humedad, sin embargo, aquellos realizados con hidrocoloides solubles en agua presentan baja resistencia a la permeabilidad debido a que tienen naturaleza hidrofílica. Esta naturaleza hidrofílica hace que tengan afinidad por el agua permitiendo así su paso a través de la película con mayor facilidad (Garde Izquierdo, 2014).

Hay diversas técnicas para la determinación de WVP entre las que se encuentran las técnicas de sensores infrarrojos, espectrofotométricas y gravimétricas. Esta última es la más utilizada y consiste en la aclimatación de una cámara hermética a una humedad relativa y temperaturas determinadas con un desecante (como puede ser sílica gel) y, una vez aclimatada, se introducen las celdas que contienen una determinada cantidad de agua y la película sellada. Para poder determinar la permeabilidad se hacen pesadas para conocer la pérdida de peso de manera periódica.

1.6.2. Permeabilidad a lípidos

Numerosos componentes en los que se basan las películas son hidrofílicos lo que confiere a estos la propiedad como buena barrera a los lípidos, esto es interesante para aquellas películas para las que se requiere un control frente a la migración de compuestos lipídicos (Marzo Rojas, 2010).

Los métodos mediante los que se puede medir esta permeabilidad son:

- Método de la tasa de migración: se coloca un parche de algodón con grasa en uno de sus lados midiendo el tiempo hasta que se observa un cambio visual. Con este método se mide la tasa de penetración de la grasa y no la permeabilidad de esta. Es un método rápido, sencillo, barato y detecta migraciones a muy bajas concentraciones (Marzo Rojas, 2010).
- Método de la permeabilidad: se trata de realizar una medición con un sistema de dos cámaras que contienen aceite separadas por la película que se quiere estudiar colocada entre dos láminas de acero inoxidable. Las muestras de la última cámara son analizadas al principio y final del ensayo y la tasa de migración a los lípidos se determina mediante un espectrofotómetro (Marzo Rojas, 2010).

1.6.3. Permeabilidad a gases

La **permeabilidad a los gases** se puede ver como algo negativo dependiendo de la aplicación que se le quiera dar a la película y del alimento que se pretenda contener dentro del envase. Si lo que se busca es que se liberen gases producidos por el metabolismo del alimento se buscará que la película sea permeable a estos. Por otro lado, si se pretende que el contenido del envase no sufra alteraciones, como puede ser el caso de alimentos grasos, por la entrada de gases como el oxígeno se buscará que el envase tenga la menor permeabilidad posible a este.

La detección de la permeabilidad a gases de la película se puede realizar de diferentes maneras:

- Método manométrico (Dow Cell): se basa en la caracterización de la transmisión de gas en función de los cambios de presión que este gas presenta después de ser presurizado sobre la película que se estudia. La película se encuentra entre dos cámaras, en la segunda se obtienen los cambios de presión. Es un método de difícil calibración debido a que se debe hacer el ensayo a 0% de humedad relativa (Garde Izquierdo, 2014).
- Método volumétrico (Linde Cell): es un sistema similar al anterior, aunque en lugar de cambios de presión lo que se observa son los cambios de volumen que se dan en la segunda cámara. Se han de tener las mismas condiciones de humedad que en el ensayo anterior (Garde Izquierdo, 2014).
- Cromatografía de gases: como en los anteriores se tienen dos cámaras separadas por el film que se pretende estudiar. Se inyecta gas y se deja difundir hasta la segunda cámara y, a intervalos de tiempo, se toman muestras de esta y se analizan por cromatografía de gases (Marzo Rojas, 2010).

2. Objetivos

El **objetivo** de este trabajo consiste en la incorporación de carvacrol en las soluciones formadoras de films con diferentes concentraciones de nanopartículas de quitina para poder conocer qué cambios se producen en sus propiedades.

Así pues, los objetivos específicos de este trabajo son:

- Desarrollo de protocolos de elaboración de las películas con incorporación de nanopartículas de quitina y carvacrol.
- Caracterización de las propiedades fisicoquímicas (contenido de humedad, opacidad y color), mecánicas (resistencia a la tracción) y de barrera (permeabilidad al vapor de agua).

3. Diseño experimental, materiales y método

3.1. Diseño experimental

Para el desarrollo de este trabajo se plantean las siguientes formulaciones como parece representado en la **Tabla 2**:

Tabla 2. Diseño experimental de las películas biodegradables

Ensayo	Quitosano (%)	Carvacrol (% respecto al peso de quitosano)	Nanopartículas de quitina (% respecto al peso de quitosano)
Quitosano	1	0	0
Quitosano + 1,5% NWQ*	1	0	1.5
Quitosano + 3% NWQ*	1	0	3
Quitosano + Carvacrol	1	1	0
Quitosano + 1,5% NWQ* + Carvacrol	1	1	1.5
Quitosano + 3% NWQ* + Carvacrol	1	1	3

*nanopartículas de quitina

Para cada muestra se realiza la caracterización de las propiedades fisicoquímicas (espeso, humedad y opacidad) y de las propiedades tecnológicas (propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua).

3.2. Materiales utilizados

3.2.1. Componentes base

- Quitosano: los films son realizados a base de quitosano obtenido a partir del caparazón de camarones boreales o nórdicos, con un grado de desacetilación del 95% y una viscosidad de 21cP.

Tabla 3. Parámetros del quitosano utilizado

Parámetro	Resultado
Grado de desacetilación	95%
Viscosidad	21cP (mPa/s)
Materia seca	94%
Solubilidad	99.1%
Turbidez	17 NTU
Cenizas	0.9%



Figura 4. Quitosano empleado en la elaboración de las películas

- Nanopartículas de quitina: estas nanopartículas fueron suministradas por un equipo de investigación del ICTAN (Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición de CSIC) de Madrid. Se obtuvieron por hidrólisis ácida. Para ello se pesan 10 g de quitina y se colocan en un matraz con 400 ml de HCl 3N y se hierve durante 90 minutos. A continuación, se realiza una centrifugación (36000 rpm, 40 minutos, 15°C) y se lleva a cabo una diálisis por membrana durante 3-4 días hasta obtener el hidrolizado. Posteriormente se somete a la muestra a una sonicación a 95 Hz en 5 ciclos de 1 minuto a intervalos de 1 minuto. Finalmente se secan las muestras por congelación y se almacenan para su posterior uso.

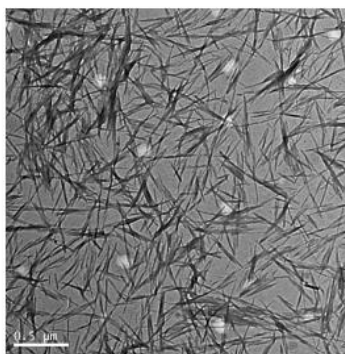


Figura 5. Nanopartículas de quitina empleadas en la elaboración de películas

- Carvacrol; el carvacrol $\geq 98\%$ fue suministrado por Sigma Aldrich Co. (Alemania)

Tabla 4. Diferentes parámetros del carvacrol utilizado

Parámetro	Resultado
Viscosidad	28.5 (mPa*s)
Temperatura de inflamación	106°C
Punto de fusión	3°C
Peso molecular	150.22 (g/mol)
Densidad	0.9756 (g/ml)

3.2.2. Materiales auxiliares

- Agua desionizada.
- Ácido acético glacial al 99%.
- Glicerol utilizado en las diferentes disoluciones como plastificante.

- Sales de sílica gel: utilizadas como desecantes en la cabina Sanplatec para conseguir el 0% de humedad relativa.
- Cabina Samplatec a 0% HR.
- Bromuro de sodio: para controlar la humedad relativa del 57% en las cabinas de aclimatación de las películas.
- Cabina a humedad controlada del 57%.
- Agitador magnético.
- Equipo de ultrasonidos (Hielscher UP400S).
- Cámara climática: para secar las películas a unas condiciones determinadas (45°C y 50% HR).
- Texturómetro
- Estufa: a 150°C para la activación de las sales de sílica gel y a 105°C para el ensayo de humedad.
- Micrómetro digital.
- Células de metacrilato.
- Guillotina de doble cizalla.

3.3. Métodos

3.3.1. Preparación de las películas

3.3.1.1. *Elaboración de films de quitosano*

Para la elaboración de los films de quitosano se utiliza un 1% (w/w) de quitosano junto a un 1% (w/w) de ácido acético y un 15% (w/w de quitosano) de glicerol en un volumen de 300 ml. Para esta disolución se utiliza un vaso de precipitados de 500 ml. Una vez pesadas las cantidades de quitosano, agua desionizada y ácido acético se agitan en una placa agitadora con un agitador magnético durante 30 minutos, para evitar que la disolución se contamine se tapan los vasos con papel de aluminio o con un platillo. Pasados los 30 minutos se extrae el agitador magnético y se sonica durante 10 minutos a 450 W en el ultrasonidos. Es importante que la disolución no se sobrecaliente, por ello se coloca hielo para evitarlo. Antes de colocar la disolución se debe limpiar el ultrasonidos con agua desionizada sonicando a máxima amplitud durante 5 minutos.



Figura 6. Ultrasonidos Hielscher UP400S

Tras esta sonicación se añade, mediante una pipeta Pasteur, un 15% de glicerol con respecto a la cantidad de quitosano. Se coloca la solución durante 2 horas y 45 minutos sobre la placa agitadora y el agitador magnético para conseguir la dispersión del glicerol, de nuevo se tapa con un platillo o papel de aluminio para evitar contaminaciones.



Figura 7. Soluciones formadoras de films en agitación

Una vez ha pasado este tiempo se vierten 81 g de la solución formadora en placas de Petri, con ayuda de una micropipeta de 20 ml, y se dejan secar en una cámara climática a 45 °C y un 50% de humedad relativa durante, al menos, 24 horas. En esta cámara climática se coloca una superficie nivelada para favorecer el secado de los films tal y como aparece en la **Figura 8**.



Figura 8. Disposición de las placas en la cámara climática

Tabla 5. Cantidad de componentes en la elaboración de las películas de quitosano

Quitosano (g)	Agua (g)	Ácido acético (g)	Glicerol (g)
3,000	293,550	3,000	0,450

3.3.1.2. *Elaboración de films de quitosano y nanopartículas de quitina*

Se elaboran films de quitosano al 1% (w/w) con nanopartículas de quitina a diferentes concentraciones (1,5% y 3% w/w respecto al quitosano) en una solución de ácido acético al 1% (w/w) para un volumen de 300 ml. Las cantidades se pueden ver en la **Tabla 6**. Para la elaboración se pesa el quitosano, las nanopartículas de quitina, el agua desionizada y el ácido acético. Se mantienen en agitación durante 30 minutos, se sonicán a máxima amplitud (450 W) durante 10 minutos y se añade el glicerol. En este caso se vuelve a poner en agitación durante 20 horas para conseguir que se dé una dispersión adecuada de las nanopartículas de quitina. Debido a que esta agitación es muy larga se realiza una última sonicación de 10 minutos a 450 W para eliminar el exceso de aire que haya podido crearse en la solución y se vierte la solución formadora de films al igual que en la anterior elaboración.

Tabla 6. Cantidad de componentes en la elaboración de las películas de quitosano y nanopartículas de quitina

Quitosano (g)	Agua (g)	Nanowishkers de quitina (mg)	Ácido acético (g)	Glicerol (mg)
3,0	293,5	45	3,0	450
		90		

3.3.1.3. Elaboración de films de quitosano, nanopartículas de quitina y carvacrol

Se elaboran films de quitosano al 1% (w/w) con nanopartículas de quitina a diferentes concentraciones en una disolución de ácido acético al 1% (w/w) para un volumen de 300 ml y un 1% (w/w) frente al peso de quitosano. Para esto se pesa el quitosano, nanopartículas de quitina, el agua desionizada y el ácido acético y se sigue el mismo procedimiento que el explicado en la elaboración anterior hasta el final de la agitación de 20 horas. El carvacrol se adiciona, pasadas el periodo de agitación de 20 horas de agitación, con ayuda de una pipeta. Se deja la solución formadora de films en agitación durante 15 minutos para favorecer la dispersión de este y, finalmente, se sónica a máxima potencia durante 10 minutos. Se vierte en placas tal y como se ha explicado anteriormente.

Tabla 7. Cantidad de componentes en la elaboración de las películas de quitosano, nanopartículas de quitina y carvacrol

Quitosano (g)	Agua (g)	Nanowishkers de quitina (mg)	Ácido acético (g)	Glicerol (mg)	Carvacrol (mg)
3,0	293,47	45	3,0	450	30
	293,43	90			

3.3.2. Caracterización de las propiedades fisicoquímicas

3.3.2.1. Espesor

La medida del espesor se realiza con un micrómetro digital (ID-F125, Mitutoyo Corp., Tokio, Japón). Este tiene una precisión de 1 μm y la medida se lleva a cabo en 10 puntos diferentes de cada muestra elegidos al azar.



Figura 9. Micrómetro digital (ID-F125, Mitutoyo Corp., Tokio, Japón)

3.3.2.2. Humedad

La **humedad** se determina mediante la pérdida de peso que sufre un film, equilibrado durante 5 días a 57% de humedad relativa. Se preparan 8 tiras de $2,5 \times 7,5$ cm.

Pasados los 5 días se colocan las muestras en un horno de convección a 105°C durante 24 horas. El contenido de humedad se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{P_0 - P_f}{P_0} \times 100$$

Donde P_0 es el peso inicial (antes de introducirlo en la estufa) y P_f el peso final (una vez transcurridas las 24 horas).

3.3.2.3. Opacidad

La **opacidad** de las películas se obtiene mediante la medición de la absorbancia a una determinada longitud de onda, 600 nm, mediante un espectrofotómetro (UH5300, Hitachi, Japón).



Figura 10. Espectrofotómetro (UH5300, Hitachi, Japón)

Para la determinación de la opacidad se obtienen, con ayuda de la cizalla, 3 tiras de 1,2 × 4 cm de 3 disoluciones diferentes. Antes de realizar la primera medida, se hace una medida en la que se utiliza el aire como referencia, una vez hecho esto se colocan las tiras en el portacubeta y se cierra la tapa. Se mide la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm. Se realizan 3 medidas para cada tira y, una vez obtenido el valor de absorbancia, se calcula la opacidad según la siguiente fórmula:

$$\text{Opacidad} = \frac{A_{600}}{X}$$

Dónde:

- A_{600} es la absorbancia resultante a una longitud de onda de 600 nm.
- X es el espesor en mm.

3.3.2.4. Color

El **color** de las películas es determinado mediante el colorímetro (Minolta CM 2500d) que proporciona las coordenadas en el espacio de color CIE $L^*a^*b^*$.



Figura 11. Colorímetro, Minolta CM 2500d

Antes de realizar la medida de la muestra se debe calibrar el equipo de manera que primero se mide el ‘cero’ (se dispara a cualquier punto de la sala, en oscuridad y a, al menos, dos metros de distancia). A continuación, se calibra el blanco sobre una placa patrón estándar ($L^* = 100$) y se pulsa ‘intro’.

Una vez calibrado el equipo se coloca el lector del colorímetro sobre la muestra y se pulsa el botón lateral, la medida se habrá realizado con éxito una vez se del haz de luz. Se realizan 10 medidas aleatorias sobre una placa base blanca (Zarandona *et al* 2020).

3.3.2.5. *Análisis SEM*

Las propiedades finales de las películas que contienen tanto nanopartículas de quitina como carvacrol dependen de la dispersión de sus componentes, para ello se observó la morfología de la superficie de las películas basadas en quitosano. Las imágenes SEM fueron realizadas el detector de electrones secundarios clásicos puesto que se obtuvieron mejores resultados. Previo a su análisis se procede a una criofractura de las muestras en su sección transversal.

Estos análisis fueron realizados por el servicio de apoyo a la investigación (SAI) de la Universidad de Zaragoza.

3.3.2.6. *Estabilidad de las soluciones formadoras de films*

El análisis de la **estabilidad de las emulsiones** creadas se realiza con el TURBISCAN^{LAB}, para ello se deben introducir 20 ml en el vial. Las muestras se introducen en el dispositivo automático que es capaz de medir las intensidades transmitidas y retrodispersadas (ángulo de 45°) de un haz incidente de longitud de onda 880 nm.



Figura 12. Turbiscan, llenado del vial de manera correcta e introducción de este

El dispositivo se configura para realizar un escaneo de toda la muestra cada minuto durante 1 hora. Basado en el cambio en las mediciones de intensidad a lo largo del tiempo el

software que tiene el equipo calcula el índice de estabilidad de la solución (TSI). El TSI se calcula gracias a la siguiente ecuación:

$$TSI = \sum_i \frac{\sum_h |scan_i(h) - scan_{i-1}(h)|}{H}$$

Así pues, se compara cada barrido de una medida ($scan_i(h)$) con el de la medida anterior ($scan_{i-1}(h)$), esto se divide por la altura total (H) para obtener un resultado que no dependa de la cantidad de producto que tenga el vial.

3.3.3. Caracterización de las propiedades tecnológicas

3.3.3.1. Propiedades mecánicas

Para la caracterización de las propiedades mecánicas de las películas se sigue la Norma ATSM D882, 2000. El dispositivo empleado para los ensayos de tracción es un texturómetro *Texture Analyzeer TA-XTZi* junto con el programa *Texture Expert Exceed*. Se emplean las condiciones establecidas en el proyecto ‘Tensión Films’ con una distancia inicial entre las pinzas de 50 mm y una velocidad del cabezal del ensayo de 0,8 mm/segundo. Con este ensayo se obtienen los valores de **Tensión Máxima** y **Elongación de Rotura** que permiten comparar las muestras con distintos materiales en función de la resistencia y la flexibilidad respectivamente.



Figura 13. Texturómetro Texture Analyzer TA-XTZi7

Para la realización del ensayo se obtienen 10 tiras de 25×75 mm de las diferentes disoluciones y se equilibran durante 7 días en una cabina acondicionada al 57% de humedad relativa gracias a sales de bromuro de sodio (NaBr). Las tiras son cortadas con la ayuda de una guillotina de doble cizalla.

Antes de proceder a ejecutar el ensayo se mide el área, sección, espesor y gramaje de cada muestra. Tras esto se realiza la prueba y se obtienen los gráficos de fuerza (N) frente a distancia (mm). Con este gráfico se pueden obtener los parámetros que interesa conocer (Tensión máxima y Elongación relativa de rotura). Para esto se tienen en cuenta las siguientes relaciones:

$$Sección = anchura \times espesor [mm^2]$$

$$Área = anchura \times longitud [mm^2]$$

$$Gramaje = \frac{peso}{\text{área}} \left[\frac{g}{m^2} \right]$$

$$Tensión\ máxima = \frac{fuerza\ máxima}{sección} \left[\frac{N}{mm^2} \right]$$

$$Elongación\ relativa\ (\%) = \frac{elongación\ máxima}{separación\ entre\ las\ pinzas} \times 100$$

3.3.3.2. Permeabilidad al vapor de agua

La **permeabilidad al vapor de agua** (*Water Vapor Permeability, WVP*) es una medida de la facilidad con la que un material deja traspasar el vapor de agua. La permeabilidad consiste en el proceso de solución y difusión desde el permeante se disuelve en una cara del material, difunde a través de él hacia el otro lado debido al gradiente de concentración y entonces se desorbe por evaporación. Este proceso de difusión a través del material depende del tamaño, forma y polaridad de la molécula que difunde, así como de la naturaleza, estructura y características del material. Para calcular la permeabilidad de la película al vapor de agua se determina la velocidad de transmisión al vapor de agua (WVTR) y la permeación.

Antes de realizar el experimento se han de poner sales de sílica gel a secar en una estufa a 150°C durante 20 horas para, a continuación, introducirlos en la cabina Sanplatec durante 24 horas y encender el ventilador para conseguir que esta se aclimate a un 0% de humedad relativa. El ventilador consigue el movimiento del aire a 150 m/min para mantener unas condiciones de ensayo uniformes en todos los puntos.



Figura 14. Montaje de las células de metacrilato (izq) y cabina Sanplatec (dcha)

Para realizar la medida de la permeabilidad se cortan muestras de film en círculos de 8 cm de diámetro y se mide el espesor con el micrómetro digital. A continuación, se dispensan 6 ml de agua desionizada en el interior de cada célula de metacrilato y se dispondrá el film cuidadosamente puesto que no se debe mojar y se atornilla la tapa. Se pesa en la balanza el sistema montado y se introduce en la cabina Sanplatec que se encuentra al 0% de HR y a 25°C. Se realizan, en intervalos de 2 horas, un total de 5 medidas.

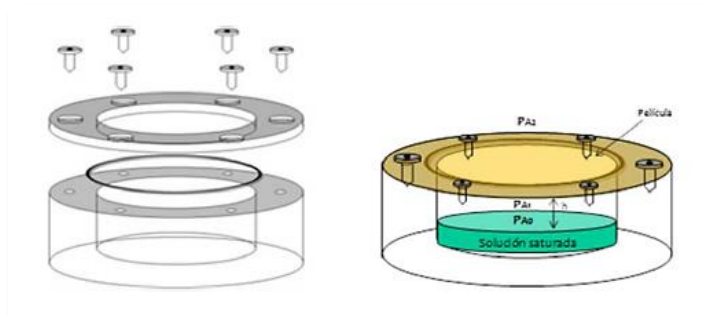


Figura 15. Células de metacrilato empleadas en el ensayo y esquema del sistema que se crea

Para el cálculo de la permeabilidad al vapor de agua (WVP) se ha de determinar en primer lugar la WVTR y la permeación, para ello se tienen en cuenta las siguientes ecuaciones:

$$WVTR = \frac{\text{pérdida de agua}}{t \times \text{área}} \left[\frac{g}{h \times m^2} \right]$$

$$\text{Permeación} = \frac{WVTR}{P_{A1} - P_{A2}} \left[\frac{g}{h \times m^2 \times KPa} \right]$$

$$\text{Permeabilidad} = WVTR \times \text{Permeación} \left[\frac{g}{h \times m^2 \times KPa} \right]$$

Para los cálculos se ha de tener en cuenta el gradiente de humedades creado entre uno y otro lado de la película que regula la transferencia de vapor de agua de la cara interna hacia la externa tal y como aparece en la **Figura 15**. Así pues, en el sistema montado la presión parcial por encima del film (PA2) se considera cero por la acción de las sales desecantes y la renovación del aire por la acción del ventilador. La cara interna de la película queda expuesta a una humedad relativa del 100% y la cara externa al 0%.

3.3.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa informático Statgraphics Centurion 18 X64. Se analizaron los resultados obtenidos en las pruebas de opacidad, color, humedad, tracción (tensión máxima de rotura y elongación relativa), espesor y permeabilidad al vapor de agua (WVP).

Los factores estudiados fueron la concentración de nanopartículas, la presencia de carvacrol y los días (en los resultados de opacidad), con la finalidad de conocer si existen o no diferencias significativas para un nivel de confianza del 95%.

En este análisis estadístico se compararán las diferentes variables comparando las distintas formulaciones con su control, es decir, en el caso de las soluciones formadoras que únicamente contienen nanopartículas se compararán con su control de quitosano y las que contienen tanto carvacrol como nanopartículas se comparan con la de quitosano y carvacrol.

4. Resultados

4.1. Apariencia y estabilidad de las soluciones formadoras de films

Como se puede observar en la **Figura 16** la solución formadora de films de quitosano presenta un color ligeramente amarillento bastante transparente y homogéneo. En las siguientes, con la adición de nanopartículas de quitina y/o carvacrol aumenta mínimamente el color amarillo.



Figura 16. Apariencia de las diferentes soluciones formadoras de films. Qitosano (A), 1,5% NWQ (B), 3%NWQ (C), 1%Carvacrol (D), 1% Carvacrol+1,5%NWQ (E), 1%Carvacrol+3%NWQ (F)

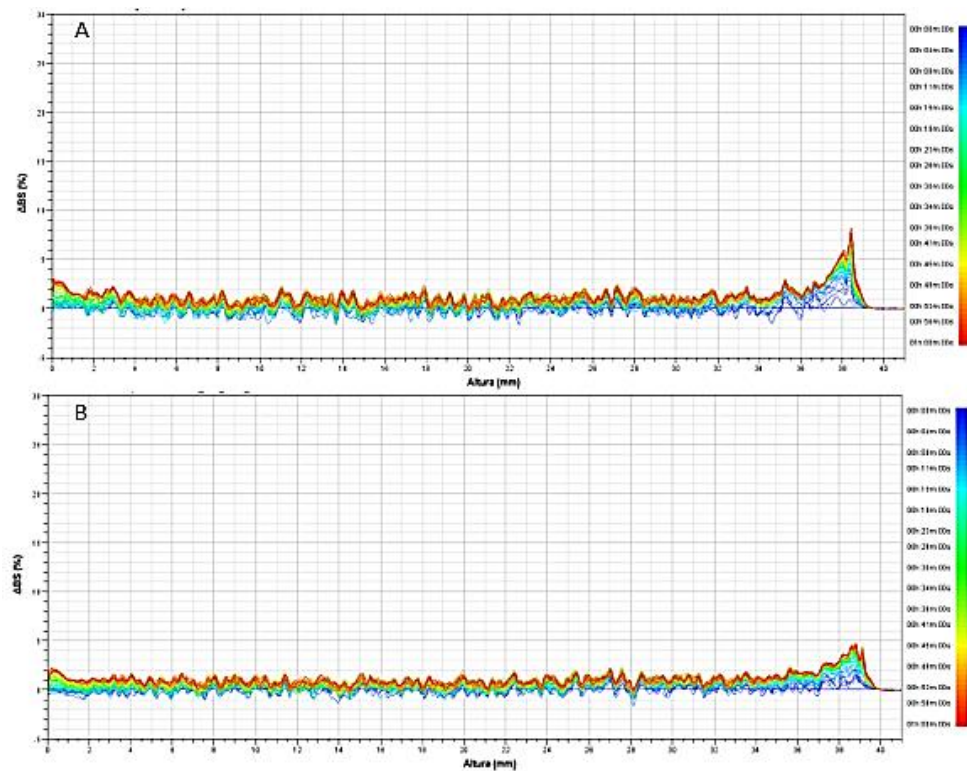


Figura 17. Representación de ΔBS en función de la altura del vial para identificar la desestabilización de la muestra. Qitosano (A), 1%Carvacrol (B)

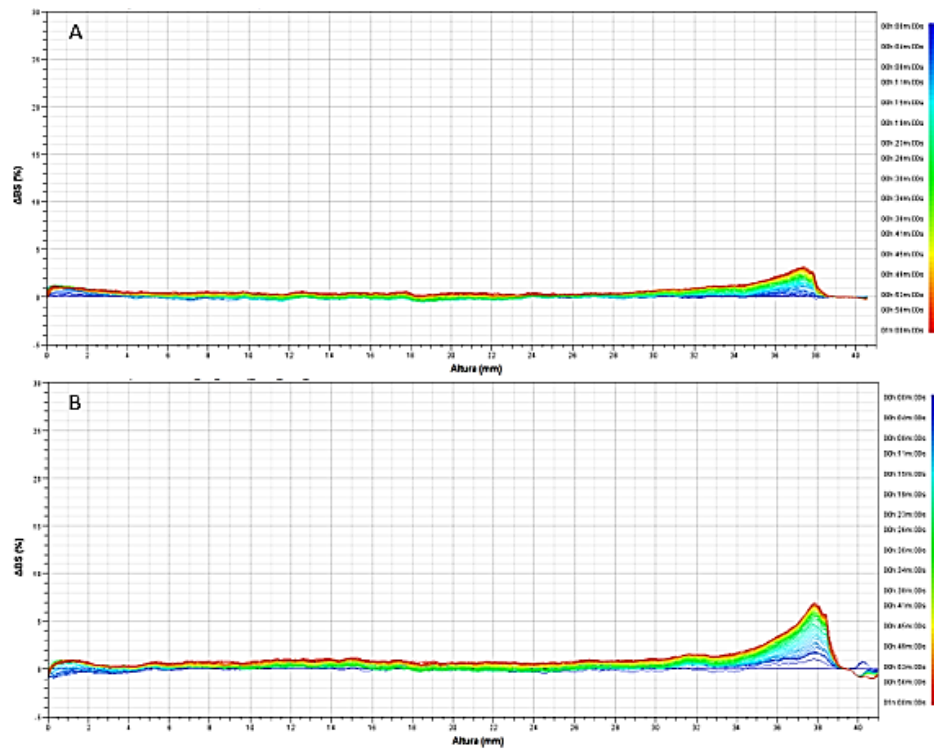


Figura 18. Representación de ΔBS en función de la altura del vial para identificar la desestabilización de la muestra. 1,5% NWQ (A), 1% Carvacrol + 1,5% NWQ (B)

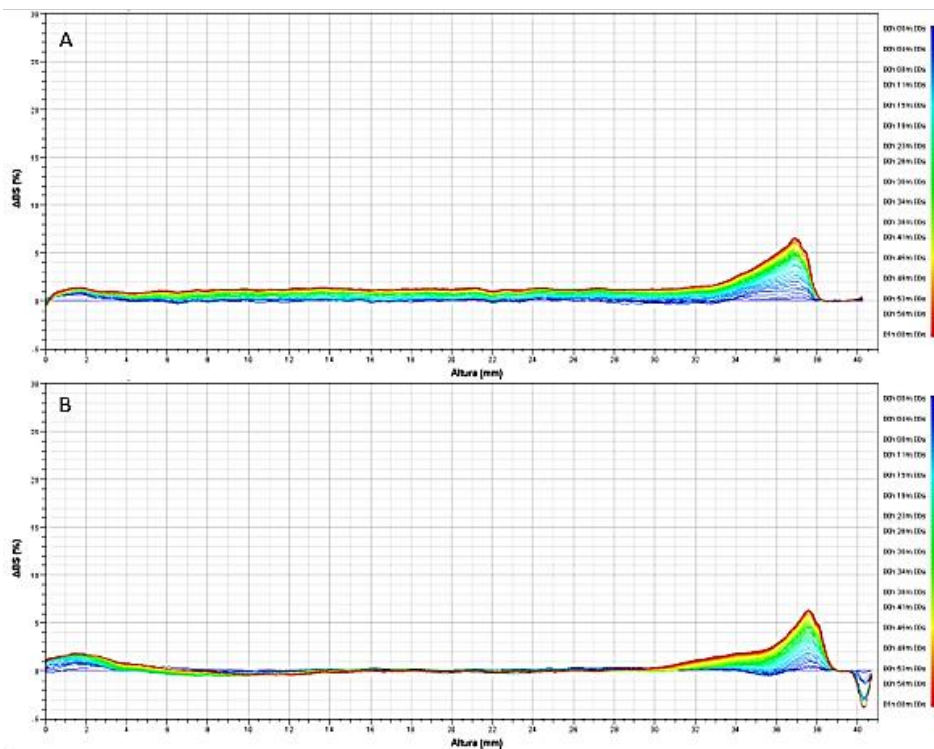


Figura 19. Representación de ΔBS en función de la altura del vial para identificar la desestabilización de la muestra. 3% NWQ (A), 1% Carvacrol + 3% NWQ (B)

Como se puede observar en las **Figura 17, 18 y 19**, en el ‘eje y’ aparece representado ΔBS , la intensidad retrodispersada y, en el ‘eje x’ la altura del vial. Los diferentes colores que se muestran son las diferentes mediciones en el tiempo. De esta manera se puede percibir que las formulaciones más inestables se corresponden con aquellas que no presentan adicionadas nanopartículas de quitina. A pesar del aumento de la estabilidad en estas soluciones se ven

picos en la zona alta del vial que corresponde a la aparición de un cremado, este es más notorio en las soluciones que contienen carvacrol.

En la **Figura 20** se muestra la evolución del índice estabilidad específico del Turbiscan (TSI) de cada solución formadora de films respecto al tiempo. Un menor valor del TSI indica una mayor estabilidad en la solución. Así, las soluciones con valores más altos de TSI son las de quitosano y quitosano + carvacrol sin NWQ. Esta inestabilidad mejora notoriamente con la adición de las nanopartículas y, sobre todo, en la formulación que contiene carvacrol junto al 3% de nanopartículas de quitina. La mayor estabilidad de las soluciones con nanopartículas se puede deber a que la matriz creada por quitosano junto con las nanopartículas de quitina impide la desestabilización de la solución debido a las posibles interacciones entre las nanopartículas de quitina y los grupos reactivos de quitosano (Wu *et al* 2019).

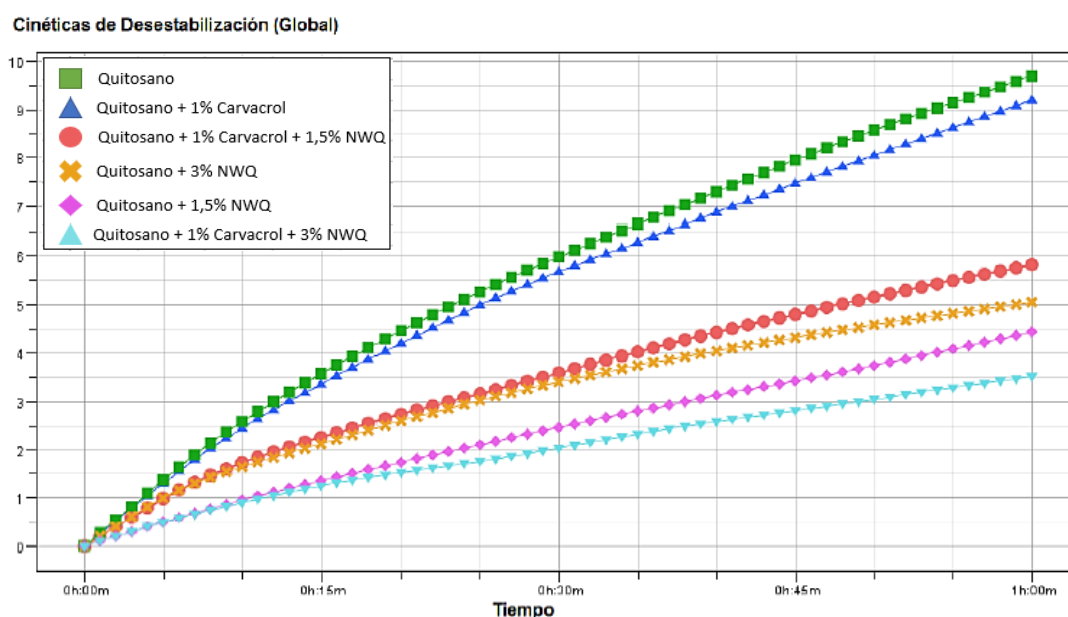


Figura 20. Índice de estabilidad de las soluciones formadoras de films específico del equipo (TSI)

4.2. Apariencia de los films

Los films de quitosano resultaron ser transparentes con una ligera coloración amarilla y superficie homogénea, tampoco se presentaron roturas ni poros apreciables. Tanto en los films con adición de nanopartículas de quitina como en los que presentan carvacrol y, al igual que los que contienen únicamente quitosano, la apariencia es transparente, aunque con algunas imperfecciones debido a la insolubilidad de la quitina. A simple vista no se aprecia un aumento de la coloración amarilla.

Todas las formulaciones llevadas a cabo se pudieron despegar con facilidad de las bases de las placas Petri, cabe destacar que las formulaciones que contienen carvacrol fueron aún más fáciles.

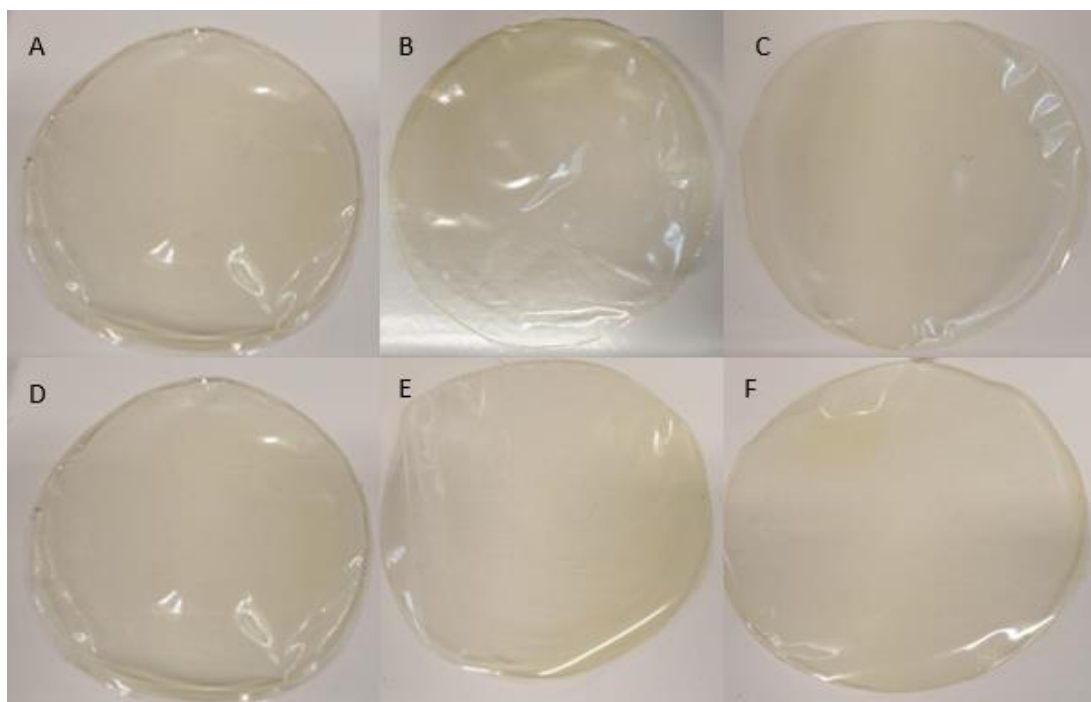


Figura 21. Apariencia de las diferentes películas una vez despegadas. Quitosano (A), 1,5% NWQ (B), 3% NWQ (C), 1% Carvacrol (D), 1% Carvacrol+1,5% NWQ (E), 1% Carvacrol+3% NWQ (F)

4.3. Análisis SEM

Como se puede observar en la **Figura 22**, las imágenes correspondientes a la formulación con un 0% de nanopartículas tiene un aspecto homogéneo y, al añadir un 1,5% de estas las películas se ven más rugosas y heterogéneas. Esto concuerda con el estudio realizado por Wu *et al* (2019) en el que se puede observar cómo, conforme aumenta la concentración de nanocristales de quitina, aumenta la heterogeneidad de la microestructura.

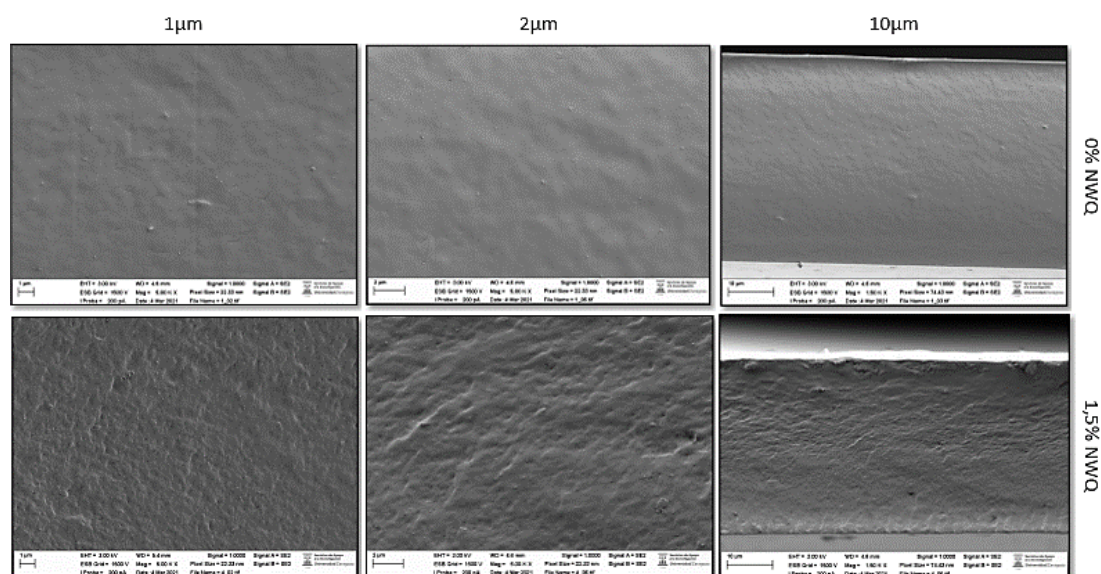


Figura 22. Microestructuras de sección transversal de películas basadas en quitosano. Imágenes facilitadas por el Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza

4.4. Opacidad

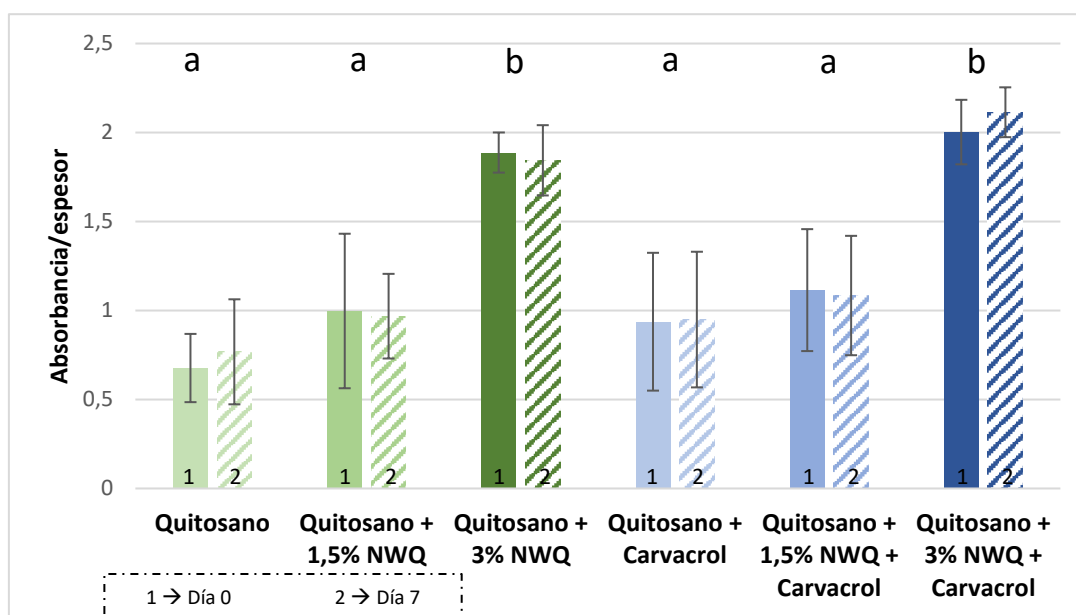


Figura 23. Valores medios de opacidad en las distintas formulaciones a día cero y después de 7 días a temperatura ambiente. Las letras en minúsculas iguales indican que no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$).

Como se puede observar en la **Figura 23** el valor de opacidad aumenta conforme aumenta la concentración en nanoquitina, esta misma tendencia se repite en las formulaciones que contienen carvacrol, aunque en estas se vea un ligero aumento en los valores medios. En las formulaciones que no contienen nanopartículas, es decir, solo quitosano o quitosano con carvacrol, como en la que contienen un 1,5% de nanopartículas de quitina los valores medios se colocan en torno a 1. En las formulaciones con un 3% de nanopartículas los valores de opacidad se mantienen en torno a 2. Para saber si existen diferencias significativas entre las formulaciones se realiza un ANOVA simple a un nivel de confianza del 95% dando como resultado que, con la adición de carvacrol no se aprecian diferencias significativas. Estas diferencias se dan con el aumento de la concentración de nanoquitina al 3%. Estos valores concuerdan con el estudio de (Wu *et al* 2019) y el de (Aghayan *et al* 2020) para los que se demuestra que tanto la adición de nanopartículas como la adición de aceite (carvacrol en este caso) aumentan la opacidad de los films debido a la disrupción de la matriz provocando una menor difusión de la luz.

Así mismo se han estudiado las diferencias en opacidades en función del tiempo y, como se puede apreciar, prácticamente no existen diferencias entre el día 0 y el día 7 para la misma formulación. Esto se comprobó mediante un ANOVA de tal manera que se confirma que el paso del tiempo no afecta a la opacidad de las películas.

4.5. Color

El valor de ΔE se corresponde a la diferencia de color entre diferentes películas para calcular este parámetro se sigue la siguiente ecuación:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Según el resultado de este valor resultante se considera que hay o no diferencias entre las muestras. Si el valor de $\Delta E > 3$ las muestras son muy diferentes, si $1.5 < \Delta E < 3$ las muestras son diferentes y si $\Delta E < 1.5$ hay poca diferencia entre las muestras.

Tabla 8. Parámetros de color para las diferentes películas, $\Delta E1$ corresponde a las comparaciones entre las diferentes formulaciones y el control 1 (Quitosano), $\Delta E2$ corresponde a las comparaciones entre las diferentes formulaciones y el control 2 (Quitosano + Carvacrol)

Formulación	L*	a*	b*	$\Delta E1$	$\Delta E2$
Quitosano	88,655 \pm 1,426 ^(a)	-0,744 \pm 0,356 ^(a)	2,839 \pm 2,083 ^(a)	-	-
Quitosano + 1,5% NWQ	87,162 \pm 1,119 ^(b)	-0,395 \pm 0,409 ^(a)	3,628 \pm 2,598 ^(a)	1,724	-
Quitosano + 3% NWQ	86,299 \pm 5,193 ^(a)	-0,860 \pm 0,652 ^(a)	4,166 \pm 5,081 ^(a)	2,706	-
Quitosano + Carvacrol	87,917 \pm 0,428 ^(a)	-0,190 \pm 0,224 ^(b)	2,543 \pm 1,235 ^(a)	0,969	-
Quitosano + 1,5% NWQ + Carvacrol	86,656 \pm 0,498 ^(c)	-0,531 \pm 0,388 ^(c)	5,600 \pm 2,671 ^(c)	-	3,324
Quitosano + 3% NWQ + Carvacrol	87,738 \pm 5,193 ^(a)	0,096 \pm 0,777 ^(a)	0,908 \pm 4,136 ^(a)	-	1,669

Como se puede observar en la **Tabla 8**, se muestran diferencias significativas en la comparación de la muestra correspondiente al quitosano + 1,5% de nanopartículas de quitina + carvacrol frente al control, quitosano + carvacrol tras haber realizado un ANOVA simple con una confianza del 95%. Esto concuerda con el valor de $\Delta E2$ puesto que es mayor a 3 (3,324) indicando que las muestras son muy diferentes. Cabe destacar que aparecen valores altos de la desviación debido a la variación en el espesor de las películas.

4.6. Contenido de humedad

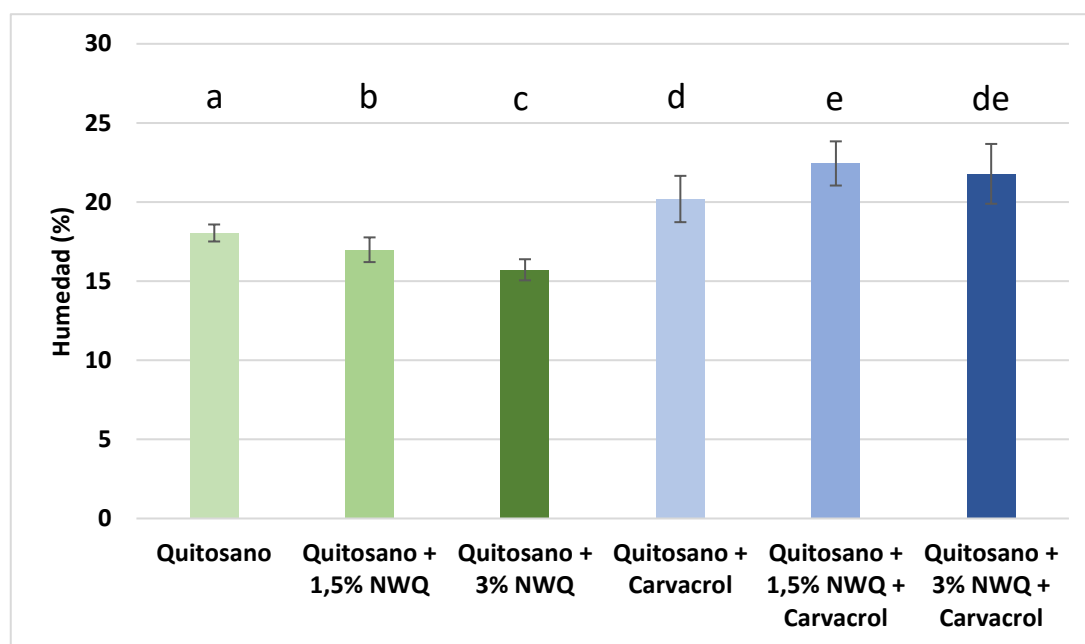


Figura 24. Valores medios del contenido de humedad de las distintas formulaciones, Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p > 0,05$)

Tal y como se puede ver en la **Figura 24** se aprecia una disminución de la humedad en las formulaciones que solo contienen nanopartículas de quitina. El film control de quitosano presenta un porcentaje de humedad del 18,04% debido a la naturaleza hidrófila del quitosano. Los films de quitosano con nanoquitina se observa que, conforme aumenta la concentración el contenido de humedad disminuye. Esto puede ser debido a que se forman interacciones moleculares entre el quitosano y las nanopartículas de quitina de manera que los grupos hidrófilos libres (Dias *et al* 2014). En cambio, con la adición del carvacrol se da un aumento de la humedad, aunque esto surge de manera inesperada este efecto ya ha sido reportado en anteriores estudios como el de Aghayan *et al* (2020) o el de Abdollahi *et al* (2012). Según estos últimos el aumento de la humedad, con una baja concentración de carvacrol, puede estar relacionada con la ruptura de la red de la película.

Para comprobar si hay diferencias significativas en cuanto al porcentaje de humedad entre las formulaciones se realiza un ANOVA simple con un nivel de confianza del 95%, Según este análisis aparecen diferencias significativas entre el control 1 (quitosano) y las tres formulaciones con las que se compara, es decir, con la que contiene un 1,5% y 3% nanopartículas de quitina y la que contiene carvacrol. Así pues, cuando se compara el control 2 (quitosano + carvacrol) se observa que se presentan diferencias significativas solamente con la muestra que contiene un 1,5% de nanopartículas.

4.7. Permeabilidad al vapor de agua

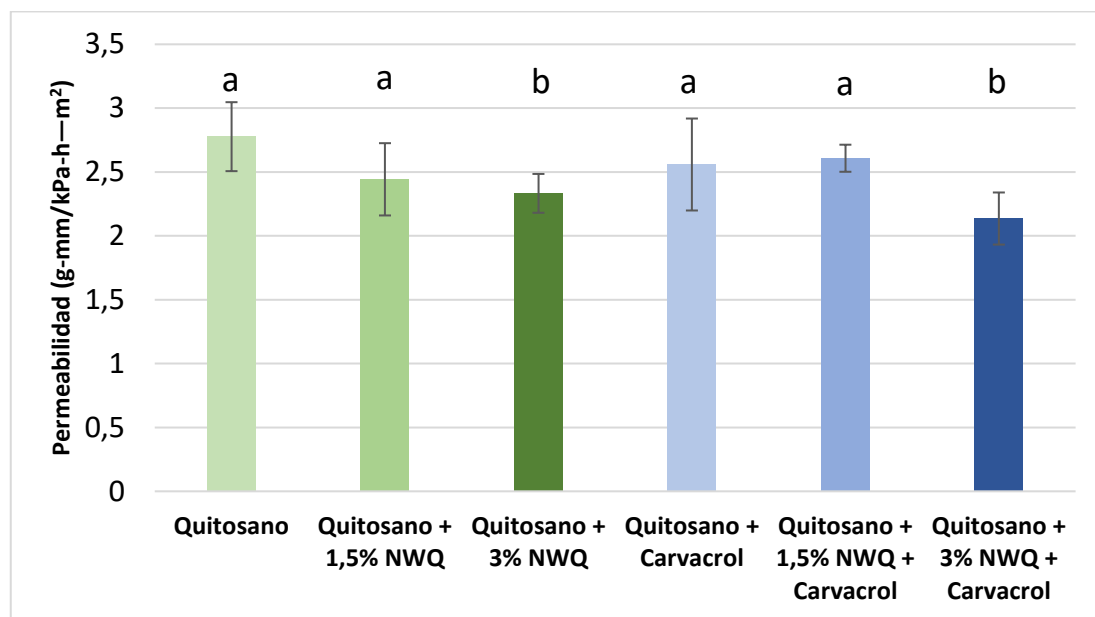


Figura 25. Permeabilidad al vapor de agua (WVP). Las letras iguales en minúsculas indican que no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$)

En la **Figura 25** se aparecen representados los valores medios de permeabilidad al vapor de agua (WVP) y se puede apreciar que aparecen diferencias significativas.

Los films compuestos pertenecientes a la formulación control de quitosano presentan una permeabilidad media de 2,78 g-mm/kPa-h-m². Estos films no suelen ser una buena barrera al vapor de agua debido a su naturaleza hidrófila, por ello se suelen añadir reforzantes para mejorar estos valores. Se realiza un ANOVA simple con un nivel de confianza del 95% para comprobar si existen diferencias significativas para la adición de las nanopartículas de quitina y del carvacrol.

Como se puede observar, con la adición de un 1,5% de nanoquitina se mejora la permeabilidad obteniendo un valor medio de 2,44 g-mm/kPa-h-m² y, con el aumento al 3% de estas nanopartículas el valor se reduce a 2,33 g-mm/kPa-h-m². Esto se puede explicar debido a que la presencia de estos nanocompuestos aumenta la tortuosidad para dificultar el movimiento del vapor de agua a través de las películas derivando en una menor permeabilidad (Wu *et al* 2019).

En cambio, con la adición de carvacrol la disminución en los valores medios no presenta diferencias significativas con el control exceptuando la formulación del 3% de nanopartículas de quitina con un valor medio de 2,14 g-mm/kPa-h-m². Estos resultados son respaldados por Nisar *et al* (2018) y Pelissari *et al* (2009), en ambos estudios los valores de permeabilidad disminuyen puesto que el carvacrol se introduce en la matriz estructural de las películas limitando el paso de las moléculas de agua.

4.8. Propiedades mecánicas

En las **Figuras 26 y 27** aparecen representados los valores medios de la tensión máxima y de elongación relativa de rotura respectivamente. Al igual que en anteriores resultados, se ha realizado un ANOVA simple con una confianza del 95% para comprobar si existen diferencias significativas entre las diferentes formulaciones.

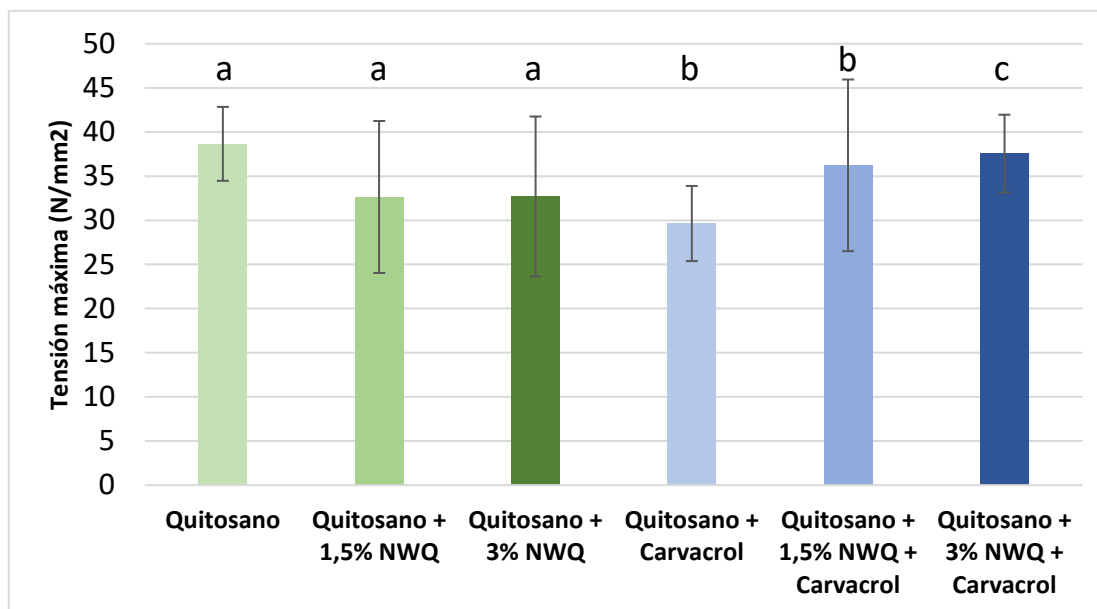


Figura 26. Valores medios de Tensión máxima, Las letras iguales en minúsculas indican que no hay diferencias significativas ($p > 0,05$)

La fuerza de tensión da una referencia de la integridad y durabilidad de una película para las potenciales aplicaciones que se puedan dar en una industria alimentaria. Como se puede observar en la **Figura 26**, la tensión máxima disminuye con la adición de las nanopartículas pasando de 38,66 N/mm² (valor medio) para la formulación control a 32,64 y 32,70 N/mm² para las concentraciones de nanoquitina del 1,5 y 3% respectivamente. Esto es debido a que con la adición de las nanopartículas se producen una serie de interacciones formando una estructura de red provocando una disminución de la rigidez. Con la adición de carvacrol se da una disminución de los valores de tensión máxima debido a la irrupción del aceite en la red formada por el quitosano (Aghayan *et al* 2020).

Se puede observar, gracias a las letras que aparecen en el gráfico, que con la adición de nanopartículas de quitina no aprecian diferencias significativas frente a la muestra de quitosano pero que con la adición de carvacrol sí. Sin embargo, al comparar las muestras con adición de nanoquitina y carvacrol frente a su control, la muestra de quitosano + carvacrol, sí que se muestran diferencias significativas en las películas que presentan una mayor concentración de nanopartículas.

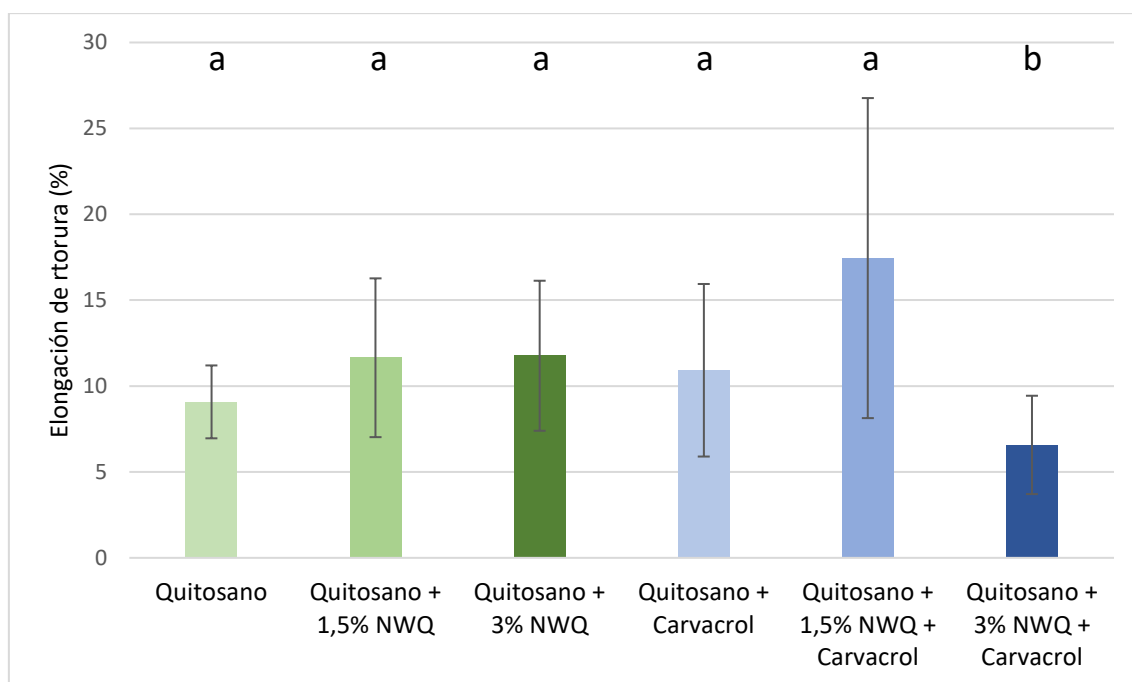


Figura 27, Valores medios de Elongación relativa de rotura, Letras iguales en minúsculas indica que no hay diferencias significativas ($p > 0,05$)

La elongación relativa es una medida que refleja las propiedades de estiramiento de los films. Así pues, en la **Figura 27**, aparecen representados los valores medios de elongación relativa en porcentaje en función de las formulaciones. Se puede observar cómo, con la adición de las nanopartículas de quitina con respecto a la formulación control ‘qitosano’, esto puede deberse a que se formen interacciones más débiles quitina-qitosano y a la formación de una red más heterogénea debido a la naturaleza hidrofóbica que presenta la quitina (Haghighi *et al* 2019).

En cuanto a las formulaciones en las que se incluye el carvacrol se muestra un aumento, especialmente en la formulación con la adición de carvacrol y 1,5% de nanopartículas de quitina en la que se muestran diferencias significativas. Esto puede deberse a que el carvacrol, al ser un aceite, tiene un comportamiento como plastificante y un efecto disruptivo en la estructura favoreciendo el estiramiento del polímero (Cao *et al* 2018). Sin embargo, la formulación correspondiente a la mayor concentración de nanoquitina (3%) y carvacrol presenta un valor medio inferior ($6,58 \pm 2,86$) lo cual puede deberse a una mala homogeneización de los componentes dando como resultado una mayor porosidad de la película (Altiok *et al* 2010). Esta última formulación es la única que presenta diferencias significativas.

5. Conclusiones

- Se ha conseguido desarrollar un protocolo de elaboración de films de qitosano con nanopartículas de quitina y carvacrol incorporados.
- Se ha incorporado diferentes concentraciones de nanopartículas de quitina, así como un 1% de carvacrol en films de qitosano obteniendo las siguientes conclusiones:
 - La adición de nanopartículas implica una mayor estabilidad en las soluciones formadoras de films.
 - No se aprecian cambios en la apariencia de los diferentes films con respecto a los controles.

- Se aprecia un aumento significativo en la opacidad de las películas con la adición del mayor porcentaje de nanopartículas tanto para las formulaciones que tienen carvacrol como para las que no.
- La incorporación de nanopartículas de quitina disminuye el contenido de humedad de los films. La adición de carvacrol produce el efecto contrario.
- Con la adición de nanopartículas se consigue que la permeabilidad al vapor de agua disminuya siguiendo la misma tendencia tanto en ausencia como en presencia de carvacrol. Sin embargo, la adición de carvacrol no consigue una disminución significativa de los valores de permeabilidad al vapor de agua.
- La adición de nanopartículas de quitina implicó una disminución de la rigidez y un aumento en la flexibilidad. Con la adición de carvacrol se consiguió unas películas más moldeables y un aumento de la flexibilidad exceptuando la formulación que contiene un 3% de nanopartículas.

6. Bibliografía

- Abdollahi, M., Rezaei, M., & Farzi, G. (2012). Improvement of active chitosan film properties with rosemary essential oil for food packaging. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(4), 847-853. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02917.x>
- Aghayan, N. S., Seyfi, J., Asadollahzadeh, M. J., Davachi, S. M., & Hasani, M. (2020). Developing multicomponent edible films based on chitosan, hybrid of essential oils, and nanofibers: Study on physicochemical and antibacterial properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 4065-4072. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.034>
- Altıok, D., Altıok, E., & Tihminlioglu, F. (2010). Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(7), 2227-2236. <https://doi.org/10.1007/s10856-010-4065-x>
- Cao, T. L., Yang, S.-Y., & Song, K. B. (2018). Development of Burdock Root Inulin/Chitosan Blend Films Containing Oregano and Thyme Essential Oils. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 131. <https://doi.org/10.3390/ijms19010131>
- Dias, M. V., Machado Azevedo, V., Borges, S. V., Soares, N. de F. F., de Barros Fernandes, R. V., Marques, J. J., & Medeiros, É. A. A. (2014). Development of chitosan/montmorillonite nanocomposites with encapsulated α -tocopherol. *Food Chemistry*, 165, 323-329. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.120>
- Díaz-Montes, E., & Castro-Muñoz, R. (2021). Edible Films and Coatings as Food-Quality Preservers: An Overview. *Foods*, 10(2), 249.
- Elsabee, M. Z., & Abdou, E. S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 33(4), 1819-1841. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.010>
- Escobar Sierra, D. M., Ossa Orozco, C. P., Quintana, M. A., & Ospina, W. A. (2013). Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparzones de crustáceos. *Scientia et Technica*, 18(1), 260-266.
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. (2012). La nanotecnología en la industria alimentaria. *Elika*, 6.
- Fúnez, A. Á., Duaso, A. I. H., & Gómez, P. M. (2016). Nanotecnología en la industria alimentaria I: Aplicaciones. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 10(2), 1-17. https://doi.org/10.5209/rev_RCCV.2016.v10.n2.53544
- Garde Izquierdo, G. (2014). *Efecto de la adición, tipo y concentración de nanoarcilla sobre las propiedades mecánicas y de barrera de películas biodegradables basadas en quitosano*. Universidad Pública de Navarra.
- George, J., & Ishida, H. (2018). A review on the very high nanofiller-content nanocomposites: Their preparation methods and properties with high aspect ratio fillers. *Progress in Polymer Science*, 86, 1-39. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2018.07.006>
- Haghighi, H., Biard, S., Bigi, F., De Leo, R., Bedin, E., Pfeifer, F., Siesler, H. W., Licciardello, F., & Pulvirenti, A. (2019). Comprehensive characterization of active chitosan-gelatin blend films enriched with different essential oils. *Food Hydrocolloids*, 95, 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.019>

- Ifuku, S., Ikuta, A., Egusa, M., Kaminaka, H., Izawa, H., Morimoto, M., & Saimoto, H. (2013). Preparation of high-strength transparent chitosan film reinforced with surface-deacetylated chitin nanofibers. *Carbohydrate Polymers*, 98(1), 1198-1202. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.033>
- Kadam, D., Momin, B., Palamthodi, S., & Lele, S. S. (2019). Physicochemical and functional properties of chitosan-based nano-composite films incorporated with biogenic silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 211, 124-132. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.005>
- Kumari, S., Rath, P., Sri Hari Kumar, A., & Tiwari, T. N. (2015). Extraction and characterization of chitin and chitosan from fishery waste by chemical method. *Environmental Technology & Innovation*, 3, 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2015.01.002>
- Kurita, K. (2006). Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8(3), 203. <https://doi.org/10.1007/s10126-005-0097-5>
- Liu, F., Jin, P., Sun, Z., Du, L., Wang, D., Zhao, T., & Doyle, M. P. (2021). Carvacrol oil inhibits biofilm formation and exopolysaccharide production of *Enterobacter cloacae*. *Food Control*, 119, 107473. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107473>
- Liu, J., Liu, S., Chen, Y., Zhang, L., Kan, J., & Jin, C. (2017). Physical, mechanical and antioxidant properties of chitosan films grafted with different hydroxybenzoic acids. *Food Hydrocolloids*, 71, 176-186. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.019>
- Lu, Y., Sun, Q., She, X., Xia, Y., Liu, Y., Li, J., & Yang, D. (2013). Fabrication and characterisation of α -chitin nanofibers and highly transparent chitin films by pulsed ultrasonication. *Carbohydrate Polymers*, 98(2), 1497-1504. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.038>
- Marzo Rojas, I. (2010). *Efecto del tipo y contenido de aceites esenciales sobre las propiedades mecánicas y barrera de películas comestibles basadas en zeína*. Universidad Pública de Navarra.
- Nisar, T., Wang, Z.-C., Yang, X., Tian, Y., Iqbal, M., & Guo, Y. (2018). Characterization of citrus pectin films integrated with clove bud essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 670-680. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.068>
- Otero-Tuárez, V., Carrión-Granda, X., Fernández-Pan, I., Fernández, T., & Maté, J. I. (2019). Combined effect of antimicrobial edible coatings with reduction of initial microbial load on the shelf-life of fresh hake (*Merluccius merluccius*) medallions. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(3), 835-843. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14003>
- Pardo de Santayana de Pablo, M. del C. (2018). *Nanotecnología y alimentación*. Universidad Complutense.
- Pelissari, F. M., Grossmann, M. V. E., Yamashita, F., & Pineda, E. A. G. (2009). Antimicrobial, Mechanical, and Barrier Properties of Cassava Starch–Chitosan Films Incorporated with Oregano Essential Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7499-7504. <https://doi.org/10.1021/jf9002363>
- Salaberria, A. M., Diaz, R. H., Labidi, J., & Fernandes, S. C. M. (2015). Role of chitin nanocrystals and nanofibers on physical, mechanical and functional properties in thermoplastic starch films. *Food Hydrocolloids*, 46, 93-102. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.12.016>

- Santos, V. P., Marques, N. S. S., Maia, P. C. S. V., Lima, M. A. B. de, Franco, L. de O., & Campos-Takaki, G. M. de. (2020). Seafood Waste as Attractive Source of Chitin and Chitosan Production and Their Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4290. <https://doi.org/10.3390/ijms21124290>
- Synowiecki, J., & Al-Khateeb, N. A. (2003). Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(2), 145-171. <https://doi.org/10.1080/10408690390826473>
- Téllez, L., Arévalo, F., Juárez, H., Altamirano, P., Ccapa, K., Chávez, J., & Visitación, L. (2014). Determinación de timol y carvacrol en hojas de orégano por HPLC FL. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 80(4), 279-286.
- Tran, T. T. B., Roach, P., Nguyen, M. H., Pristijono, P., & Vuong, Q. V. (2020). Development of biodegradable films based on seaweed polysaccharides and Gac pulp (*Momordica cochinchinensis*), the waste generated from Gac oil production. *Food Hydrocolloids*, 99, 105322. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105322>
- Williams, J. P., Williams, J. R., Kirabo, A., Chester, D., & Peterson, M. (2016). Chapter 3—Nutrient Content and Health Benefits of Insects. En A. T. Dossey, J. A. Morales-Ramos, & M. G. Rojas (Eds.), *Insects as Sustainable Food Ingredients* (pp. 61-84). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802856-8.00003-X>
- Wu, C., Sun, J., Chen, M., Ge, Y., Ma, J., Hu, Y., Pang, J., & Yan, Z. (2019). Effect of oxidized chitin nanocrystals and curcumin into chitosan films for seafood freshness monitoring. *Food Hydrocolloids*, 95, 308-317. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.047>
- Youssef, A. M., & El-Sayed, Samah. M. (2018). Bionanocomposites materials for food packaging applications: Concepts and future outlook. *Carbohydrate Polymers*, 193, 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.088>
- Yousuf, B., Sun, Y., & Wu, S. (2021). Lipid and Lipid-containing Composite Edible Coatings and Films. *Food Reviews International*, 1-24. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1876084>
- Zarandona, I., Barba, C., Guerrero, P., de la Caba, K., & Maté, J. (2020). Development of chitosan films containing β -cyclodextrin inclusion complex for controlled release of bioactives. *Food Hydrocolloids*, 104, 105720. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105720>

7. Apéndice

7.1. ANEXO I - Ficha técnica quitosano



Certificate of analysis

Product name	ChitoClear [®] (Chitosan)	Manufactured by:
Product code	44020 - Ig05LV	Primex ehf
Source	Penaeus borealis	Oskarsgate 7
Generic name	B(1→4) D-glucosamine / N-acetyl-D-glucosamine	580 Siglufjörður
Lot number	TM5581	Iceland
Revision number	Rev. 03	Ph: +354 460 6900
Date of manufacture	3.9.2020	Fax: +354 460 6909
Release date	3.9.2023	IS-A870-EFTA

PARAMETER	TEST METHOD	RESULTS	Comment
Dry Matter Content	CP-001	94 %	
Ash	CP-002	0,9 %	
Turbidity	CP-003	17 NTU	
Viscosity	CP-004 (1% solution)	21 cP (mPa.s)	
Solubility	CP-006	99,1 %	
Degree of Deacetylation	CP-010 (Catalytic reaction)	95 %	
Sieve Analysis	CP-008	100% through 100 mesh	
Tap density	CP-009	0,62 g/cc	
Appearance	CP-007	White powder	
Taste and odour	CP-007	No taste or smell	
Microbiol:			detectable limit
Aerobic plate count	NMCL 86	<1000 cfu/g	10 cfu/g
Yeast and mold	NMCL 98	<100 cfu/g	10 cfu/g
Coliform bacteria	ISO 4831	absent	10 cfu/g
E. coli	ISO 7251	absent	0,5 cfu/g
Salmonella sp.	NMCL 71	absent	Neg.
Trace Heavy Metals:			
Arsenic	SW-846 6020 ICP/MS	none detected	1,0 ppm
Cadmium	SW-846 6020 ICP/MS	none detected	0,20 ppm
Lead	SW-846 6020 ICP/MS	<1,0 ppm	0,10 ppm
Mercury	SW-846 7471 CVAA	none detected	0,01 ppm

MBR – Master Batch Record

CP – Primex Standard Test Methods

NMCL – Nordic Committee on Food Analysis

ISO – International Organization for Standardization

ICP/MS – Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

CVAA – Cold Vapor Atomic Absorption

Reported By: Katerina Bilicicova
 Name: Katerina Bilicicova
 Title: Laboratory Manager
 Date: 4. 9. 2020.

Approved By: Guðný Helga Kristjánsdóttir
 Name: Guðný Helga Kristjánsdóttir
 Title: Quality Assurance & Technical Manager
 Date: 25. 9. 2020.


Methods of analysis available upon request

NOTE: Each of colored dots indicates this document is a copy and is not controlled



Primex ehf, Oskarsgate 7, 580 Siglufjörður, Iceland, Phone: +354 460 6900, Fax: +354 460 6909

7.2. ANEXO II - Ficha técnica glicerol

	FICHA DE ESPECIFICACIONES TÉCNICAS	ET-05-00-01 Rev. 0
	GLICERINA PH EUR FOOD	

Fórmula Química: C₃H₈O₃

Otros Nombres: Glicerol, 1-2-3 propanotriol.

Características: Es un producto líquido, con aspecto de sirope, claro, incoloro, higroscópico y de olor suave característico. Cumple los requerimientos de la Farmacopea Europea (EP).

Nº aditivo alimentario: E 422

Composición: Glicerina de origen vegetal.

Parámetro	Especificaciones	Unidades
Contenido en propano-1,2,3-triol	≥ 99,7	%
Densidad relativa 20/20°C	1,262	-
Riqueza (base anhidra)	99,0 – 101,0	%
Color Hazen	≤ 10	-
Acidez / alcalinidad	≤ 0,2	mL
Índice de refracción	1,473 – 1,475	-
Aldehídos	≤ 10	ppm
Esteres	≥ 8	ml
Diabloglicol	≤ 0,1	%
Impurezas después del pico de glicerina (CG)	≤ 0,5	%
Impurezas antes del pico de glicerina (CG)	≤ 0,1	%
Compuestos halogenados	≤ 35	ppm
Azúcares	pasa	-
Cloruros	≤ 10	ppm
Metales pesados	≤ 5	ppm
Agua	≤ 0,3	%
Carbóna sulfata	≤ 0,01	%
Plomo	≤ 2	ppm
Arsénico	≤ 3	ppm
Cadmio	≤ 1	ppm
Mercurio	≤ 1	ppm

Estas informaciones corresponden al estado actual de nuestros conocimientos y se suministra de buena fe. Sin embargo, corresponde al usuario la responsabilidad de cerciorarse que el producto es apropiado para el uso particular al que se le destina y se manipula de acuerdo la legislación aplicable, tanto local como nacional.

****NOTA**:** Especificaciones mínimas de los productos requeridos por Productos OPPAC, S.A.

PRODUCTOS OPPAC, S.A.
Departamento de Calidad

7.3. ANEXO III - Ficha técnica carvacrol

Identificadores de productos químicos

CAS	499-75-2
Peso molecular (g/mol)	150.22
Nombre IUPAC	2-metil-5-(propan-2-il)fenol

Fórmula molecular	C ₁₀ H ₁₄ O
Clave InChI	RECUKUPTGUEGMW-UHFFFAOYSA-N
SMILES	<chem>CC(C)C1=CC=C(C(C)C)C(O)=C1</chem>

Especificaciones

Nombre del producto químico o material	Carvacrol
Temperatura de inflamación	106°C
Viscosidad	28.5 mPa.s (20°C)
Punto de fusión	3.0°C
CAS	499-75-2
Fórmula lineal	(CH ₃) ₂ CHC ₆ H ₃ (CH ₃)OH
Información de solubilidad	Solubility aq. soln.: insoluble. Other solubilities: soluble in ethanol and ether
SMILES	<chem>CC(C)C1=CC=C(C(C)C)C(O)=C1</chem>
Peso molecular (g/mol)	150.22

Densidad	0.9760 g/mL
Gravedad específica	0.976
Punto de ebullición	238.0°C
Cantidad	100 g
Fórmula molecular	C ₁₀ H ₁₄ O
Índice Merck	15, 1872
Clave InChI	RECUKUPTGUEGMW-UHFFFAOYSA-N
Nombre IUPAC	2-metil-5-(propan-2-il)fenol
Formula Weight (peso de la fórmula)	150.22

7.4. ANEXO IV - Opacidad

Tabla 9, Datos de opacidad para todos los films elaborados

Formulación	Promedio día 0	Promedio día 7	Media total día 0	Media total día 7
Quitosano	0,469	0,457	0,677±0,192	0,768±0,295
	0,716	0,803		
	0,846	1,044		
Quitosano + 1,5% NWQ	0,684	0,717	0,997±0,434	0,968±0,238
	0,815	1,190		
	1,493	0,997		
Quitosano + 3% NWQ	1,780	1,643	1,891±0,118	1,844±0,198
	2,005	2,038		
	1,877	1,850		
Quitosano + Carvacrol	1,384	1,389	0,937±0,387	0,949±0,381
	0,722	0,733		
	0,705	0,725		
Quitosano + 1,5% NWQ + Carvacrol	1,476	1,428	1,114±0,343	1,084±0,335
	1,073	1,067		
	0,795	0,758		
Quitosano + 3% NWQ + Carvacrol	2,036	2,133	2,002±0,181	2,114±0,140
	2,165	2,244		
	1,807	1,965		

7.5. ANEXO V - Contenido en humedad

Tabla 10, Datos de los pesos iniciales y finales (g) de todos los films elaborados

Formulación	p0	pf	Humedad (%)	Media
Quitosano	0,150	0,123	18,333	18,045 ± 0,537
	0,137	0,112	18,518	
	0,144	0,118	18,361	
	0,155	0,126	18,419	
	0,122	0,101	17,393	
	0,124	0,103	17,129	
	0,143	0,118	17,783	
	0,155	0,126	18,419	
Quitosano + 1,5% NWQ	0,107	0,088	17,495	16,985 ± 0,781
	0,124	0,103	16,968	
	0,133	0,109	17,805	
	0,112	0,093	16,536	
	0,128	0,108	15,531	
	0,174	0,143	17,839	
	0,161	0,134	16,497	
	0,132	0,109	17,212	
Quitosano + 3% NWQ	0,147	0,123	16,170	15,718 ± 0,667
	0,138	0,116	15,638	
	0,172	0,143	16,581	
	0,132	0,112	15,242	
	0,152	0,130	14,684	
	0,153	0,130	15,183	
	0,157	0,131	16,478	
	0,109	0,092	15,771	
Quitosano + Carvacrol	0,191	0,148	22,513	20,692 ± 1,464
	0,138	0,109	21,014	
	0,154	0,120	22,078	
	0,144	0,113	21,528	
	0,157	0,126	19,745	
	0,106	0,088	20,981	
	0,143	0,115	19,580	
	0,105	0,086	18,095	
Quitosano + 1,5% NWQ + Carvacrol	0,173	0,131	24,277	22,440 ± 1,396
	0,182	0,139	23,626	
	0,146	0,116	20,548	
	0,088	0,069	21,591	
	0,138	0,105	23,913	
	0,158	0,122	22,785	
	0,132	0,104	21,212	
	0,153	0,120	21,569	

Formulación	p0	pf	Humedad (%)	Media
Quitosano + 3% NWQ + Carvacrol	0,120	0,097	19,167	21,781 ± 1,890
	0,153	0,121	20,915	
	0,153	0,116	24,183	
	0,187	0,144	22,995	
	0,120	0,097	19,167	
	0,145	0,113	22,069	
	0,162	0,126	22,222	
	0,153	0,117	23,529	

7.6. ANEXO VI - Propiedades de barrera

Tabla 11. Resultados obtenidos de la permeabilidad al vapor de agua de las distintas formulaciones

Formulación	Permeabilidad (g·mm/kPa·h·m ²)	Media
Quitosano	2,452	2,777±0,270
	2,639	
	2,727	
	3,160	
	2,908	
Quitosano + 1,5% NWQ	2,272	2,443±0,283
	2,450	
	2,932	
	2,277	
	2,286	
Quitosano + 3% NWQ	2,316	2,333±0,152
	2,358	
	2,123	
	2,552	
	2,316	
Quitosano + Carvacrol	2,271	2,559±0,360
	2,952	
	2,095	
	2,741	
	2,739	
Quitosano + 1,5% NWQ + Carvacrol	2,677	2,608±0,106
	2,474	
	2,523	
	2,728	
	2,637	
Quitosano + 3% NWQ + Carvacrol	2,083	2,136±0,204
	2,254	
	1,845	
	2,108	
	2,389	

7.7. ANEXO VII - Propiedades mecánicas

Tabla 12. Datos medios del espesor, peso, sección, área y gramaje de las distintas formulaciones

Formulación	Espesor (μm)	Peso (mg)	Sección (mm^2)	Área (mm^2)	Gramaje (g/m^2)
Quitosano	62,00 \pm 11,00	0,13 \pm 0,02	1,55 \pm 0,27	1875,00 \pm 0,00	69,71 \pm 11,55
Quitosano + 1,5% NWQ	61,00 \pm 11,00	0,14 \pm 0,03	1,53 \pm 0,27	1875,00 \pm 0,00	72,43 \pm 13,25
Quitosano + 3% NWQ	84,00 \pm 55,00	0,12 \pm 0,02	2,10 \pm 1,37	1875,00 \pm 0,00	66,36 \pm 10,03
Quitosano + Carvacrol	58,00 \pm 9,00	0,13 \pm 0,02	1,46 \pm 0,24	1875,00 \pm 0,00	69,51 \pm 10,65
Quitosano + 1,5% NWQ + Carvacrol	60,00 \pm 13,00	0,14 \pm 0,03	1,50 \pm 0,33	1875,00 \pm 0,00	72,85 \pm 14,52
Quitosano + 3% NWQ + Carvacrol	60,00 \pm 14,00	0,13 \pm 0,02	1,70 \pm 0,34	1875,00 \pm 0,00	70,83 \pm 10,16

Tabla 13. Propiedades mecánicas para la formulación de Quitosano

Quitosano													
N° de nuestra	Dimensiones Longitudes (mm)	Anchura (mm)	Espesor (mm)	Peso (g)	Sección (mm ²)	Área (mm ²)	Área (m ²)	Gramaje (g/m ²)	Fuerza máxima (N)	Elongación de rotura (mm)	Separación pinzas (mm)	Elongación relativa (%)	Tensión máxima de rotura (N/mm ²)
1	75,000	25,000	0,054	0,117	1,350	1875,000	0,001875	62,400	57,957	4,575	50,000	9,1500	42,931
2	75,000	25,000	0,047	0,106	1,175	1875,000	0,001875	56,533	50,898	4,099	50,000	8,1980	43,317
3	75,000	25,000	0,063	0,120	1,575	1875,000	0,001875	64,000	63,838	3,427	50,000	6,8540	40,532
4	75,000	25,000	0,080	0,170	2,000	1875,000	0,001875	90,667	70,583	4,535	50,000	9,0700	35,292
5	75,000	25,000	0,054	0,115	1,350	1875,000	0,001875	61,333	57,573	6,043	50,000	12,086	42,647
6	75,000	25,000	0,064	0,134	1,595	1875,000	0,001875	71,467	67,308	3,763	50,000	7,5260	42,199
7	75,000	25,000	0,072	0,156	1,800	1875,000	0,001875	83,200	57,003	3,167	50,000	6,3340	31,668
8	75,000	25,000	0,075	0,153	1,875	1875,000	0,001875	81,600	65,519	4,107	50,000	8,2140	34,943
9	75,000	25,000	0,052	0,113	1,300	1875,000	0,001875	60,267	49,026	6,275	50,000	12,550	37,712
10	75,000	25,000	0,058	0,123	1,463	1875,000	0,001875	65,600	51,702	5,403	50,000	10,806	35,352

Tabla 14. Propiedades mecánicas para la formulación de Quitosano+ 1,5% NWQ

Quitosano + 1,5% NWQ													
N° de nuestra	Dimensiones Longitudes (mm)	Anchura (mm)	Espesor (mm)	Peso (g)	Sección (mm²)	Área (mm²)	Área (m²)	Gramaje (g/m²)	Fuerza máxima (N)	Elongación de rotura (mm)	Separación pinzas (mm)	Elongación relativa (%)	Tensión máxima de rotura (N/mm²)
1	75,000	25,000	0,046	0,113	1,150	1875,000	0,001875	60,267	44,150	4,591	50,000	9,182	38,391
2	75,000	25,000	0,056	0,122	1,400	1875,000	0,001875	65,067	38,724	10,723	50,000	21,446	27,660
3	75,000	25,000	0,070	0,132	1,750	1875,000	0,001875	70,400	33,430	6,051	50,000	12,102	19,103
4	75,000	25,000	0,054	0,121	1,350	1875,000	0,001875	64,533	48,831	7,307	50,000	14,614	36,171
5	75,000	25,000	0,071	0,140	1,775	1875,000	0,001875	74,667	52,872	4,291	50,000	8,582	29,787
6	75,000	25,000	0,067	0,141	1,675	1875,000	0,001875	75,200	53,248	2,803	50,000	5,606	31,790
7	75,000	25,000	0,060	0,145	1,500	1875,000	0,001875	77,333	52,720	5,291	50,000	10,582	35,147
8	75,000	25,000	0,065	0,155	1,625	1875,000	0,001875	82,667	57,758	4,091	50,000	8,182	35,543
9	75,000	25,000	0,077	0,189	1,925	1875,000	0,001875	100,800	44,176	5,047	50,000	10,094	22,949
10	75,000	25,000	0,046	0,100	1,150	1875,000	0,001875	53,333	57,326	8,043	50,000	16,086	49,849

Tabla 15. Propiedades mecánicas para la formulación de Quitosano + 3% NWQ

Quitosano + 3% NWQ													
Nº de nuestra	Dimensiones Longitudes (mm)	Anchura (mm)	Espesor (mm)	Peso (g)	Sección (mm ²)	Área (mm ²)	Área (m ²)	Gramaje (g/m ²)	Fuerza máxima (N)	Elongación de rotura (mm)	Separación pinzas (mm)	Elongación relativa (%)	Tensión máxima de rotura (N/mm ²)
1	75,000	25,000	0,086	0,160	2,150	1875,000	0,001875	85,333	69,205	10,123	50,000	20,246	32,188
2	75,000	25,000	0,060	0,124	1,500	1875,000	0,001875	66,133	57,117	6,775	50,000	13,550	38,078
3	75,000	25,000	0,236	0,108	5,900	1875,000	0,001875	57,600	48,129	6,971	50,000	13,942	8,157
4	75,000	25,000	0,076	0,143	1,900	1875,000	0,001875	76,267	62,470	4,639	50,000	9,278	32,879
5	75,000	25,000	0,071	0,114	1,775	1875,000	0,001875	60,960	64,983	6,403	50,000	12,806	36,610
6	75,000	25,000	0,080	0,138	2,000	1875,000	0,001875	73,600	60,837	3,991	50,000	7,982	30,419
7	75,000	25,000	0,068	0,132	1,700	1875,000	0,001875	70,400	64,272	4,823	50,000	9,646	37,807
8	75,000	25,000	0,055	0,108	1,375	1875,000	0,001875	57,600	47,995	3,295	50,000	6,590	34,905
9	75,000	25,000	0,060	0,118	1,500	1875,000	0,001875	62,933	57,191	8,107	50,000	16,214	38,127
10	75,000	25,000	0,049	0,099	1,225	1875,000	0,001875	52,800	46,343	3,695	50,000	7,390	37,831

Tabla 16. Propiedades mecánicas para la formulación de Quitosano + Carvacrol

Quitosano + Carvacrol													
No de nuestra	Dimensiones Longitudes (mm)	Anchura (mm)	Espesor (mm)	Peso (g)	Sección (mm ²)	Área (mm ²)	Área (m ²)	Gramaje (g/m ²)	Fuerza máxima (N)	Elongación de rotura (mm)	Separación pinzas (mm)	Elongación relativa (%)	Tensión máxima de rotura (N/mm ²)
1	75,000	25,000	0,069	0,137	1,725	1875,000	0,001875	73,067	41,732	10,779	50,000	21,558	24,192
2	75,000	25,000	0,063	0,139	1,575	1875,000	0,001875	74,133	39,165	5,947	50,000	11,894	24,867
3	75,000	25,000	0,072	0,157	1,800	1875,000	0,001875	83,733	40,544	8,635	50,000	17,270	22,524
4	75,000	25,000	0,045	0,096	1,125	1875,000	0,001875	51,200	32,560	4,483	50,000	8,966	28,942
5	75,000	25,000	0,062	0,138	1,550	1875,000	0,001875	73,600	51,039	5,719	50,000	11,438	32,928
6	75,000	25,000	0,051	0,116	1,275	1875,000	0,001875	61,867	43,186	5,135	50,000	10,270	33,871
7	75,000	25,000	0,067	0,159	1,675	1875,000	0,001875	84,800	53,050	3,651	50,000	7,302	31,672
8	75,000	25,000	0,049	0,114	1,225	1875,000	0,001875	60,800	38,921	2,935	50,000	5,870	31,772
9	75,000	25,000	0,053	0,132	1,325	1875,000	0,001875	70,400	44,823	2,999	50,000	5,998	33,829
10	75,000	25,000	0,051	0,115	1,275	1875,000	0,001875	61,493	40,505	4,319	50,000	8,638	31,769

Tabla 17. Propiedades mecánicas para la formulación de Quitosano + 1,5% NWQ + Carvacrol

Quitosano + 1,5% NWQ + Carvacrol													
No de nuestra	Dimensiones Longitudes (mm)	Anchura (mm)	Espesor (mm)	Peso (g)	Sección (mm ²)	Área (mm ²)	Área (m ²)	Gramaje (g/m ²)	Fuerza máxima (N)	Elongación de rotura (mm)	Separación pinzas (mm)	Elongación relativa (%)	Tensión máxma de rotura (N/mm2)
1	75,000	25,000	0,056	0,125	1,400	1875,000	0,001875	66,667	47,463	12,459	50,000	24,918	33,902
2	75,000	25,000	0,057	0,118	1,425	1875,000	0,001875	62,933	45,404	11,947	50,000	23,894	31,862
3	75,000	25,000	0,047	0,124	1,175	1875,000	0,001875	66,133	52,781	15,915	50,000	31,830	44,920
4	75,000	25,000	0,053	0,144	1,325	1875,000	0,001875	76,800	56,278	14,043	50,000	28,086	42,474
5	75,000	25,000	0,068	0,123	1,700	1875,000	0,001875	65,600	38,181	4,775	50,000	9,550	22,459
6	75,000	25,000	0,093	0,117	2,325	1875,000	0,001875	62,400	49,045	9,339	50,000	18,678	21,095
7	75,000	25,000	0,055	0,200	1,375	1875,000	0,001875	106,667	64,283	4,615	50,000	9,230	46,751
8	75,000	25,000	0,052	0,168	1,300	1875,000	0,001875	89,600	59,738	3,451	50,000	6,902	45,952
9	75,000	25,000	0,064	0,118	1,600	1875,000	0,001875	62,933	47,709	3,423	50,000	6,846	29,818
10	75,000	25,000	0,054	0,129	1,350	1875,000	0,001875	68,800	58,095	7,271	50,000	14,542	43,033

Tabla 18. Propiedades mecánicas para la formulación de Quitosano + 3% NWQ + Carvacrol

Quitosano + 3% NWQ + Carvacrol													
No de nuestra	Dimensiones Longitudes (mm)	Anchura (mm)	Espesor (mm)	Peso (g)	Sección (mm ²)	Área (mm ²)	Área (m ²)	Gramaje (g/m ²)	Fuerza máxima (N)	Elongación de rotura (mm)	Separación pinzas (mm)	Elongación relativa (%)	Tensión máxma de rotura (N/mm ²)
1	75,000	25,000	0,090	0,151	2,250	1875,000	0,001875	80,533	68,429	2,523	50,000	5,046	30,413
2	75,000	25,000	0,088	0,161	2,200	1875,000	0,001875	85,867	79,742	2,867	50,000	5,734	36,246
3	75,000	25,000	0,067	0,129	1,675	1875,000	0,001875	68,800	65,922	3,139	50,000	6,278	39,356
4	75,000	25,000	0,046	0,098	1,150	1875,000	0,001875	52,267	48,756	2,483	50,000	4,966	42,397
5	75,000	25,000	0,074	0,145	1,850	1875,000	0,001875	77,333	73,663	5,367	50,000	10,734	39,818
6	75,000	25,000	0,059	0,124	1,475	1875,000	0,001875	66,133	46,205	1,539	50,000	3,078	31,325
7	75,000	25,000	0,058	0,111	1,450	1875,000	0,001875	59,200	50,994	2,423	50,000	4,846	35,168
8	75,000	25,000	0,071	0,144	1,775	1875,000	0,001875	76,800	64,283	3,151	50,000	6,302	36,216
9	75,000	25,000	0,059	0,126	1,475	1875,000	0,001875	67,200	61,945	3,123	50,000	6,246	41,997
10	75,000	25,000	0,066	0,139	1,650	1875,000	0,001875	74,133	70,190	6,259	50,000	12,518	42,539

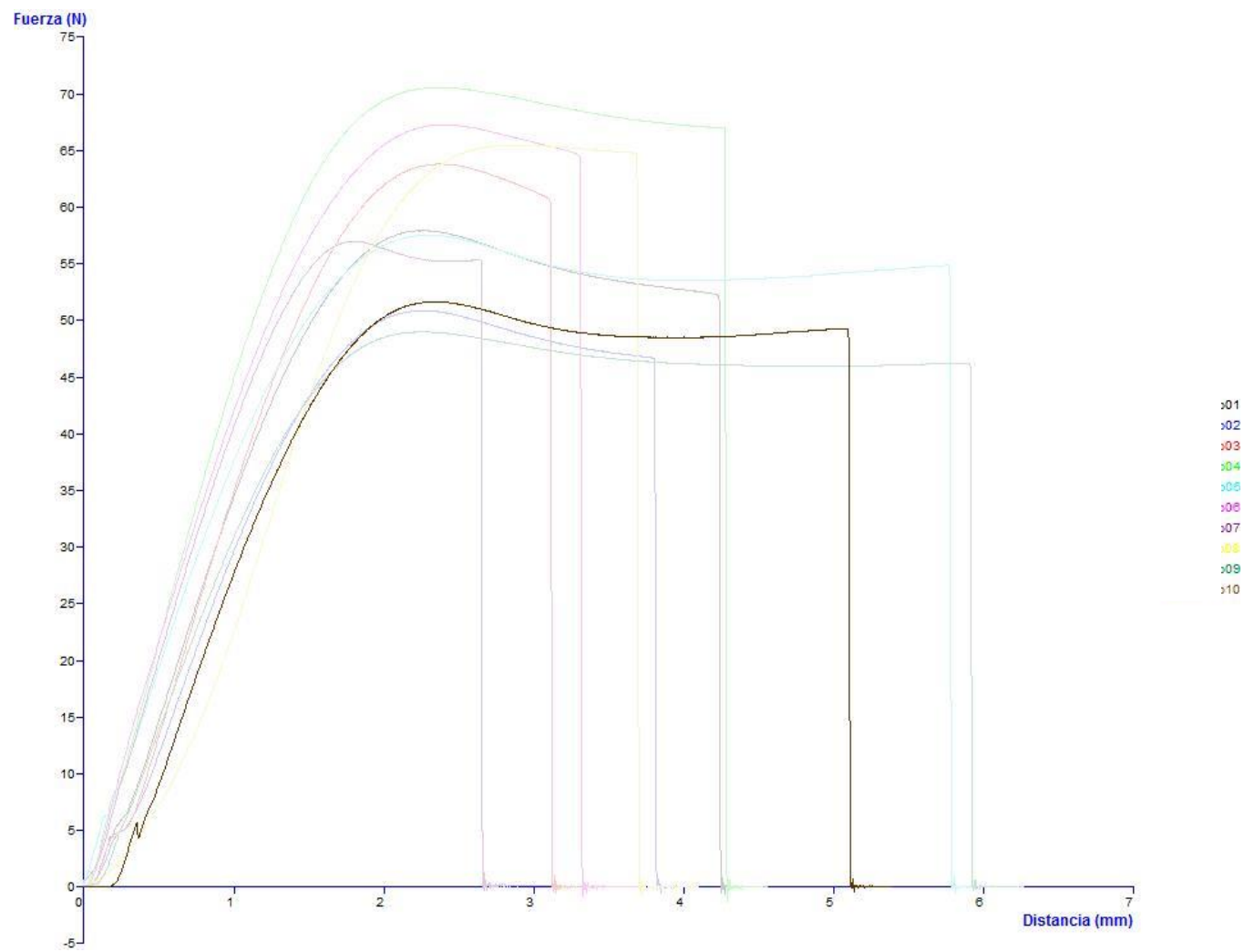


Figura 28. Representación gráfica del ensayo de tracción de la formulación de Qitosano

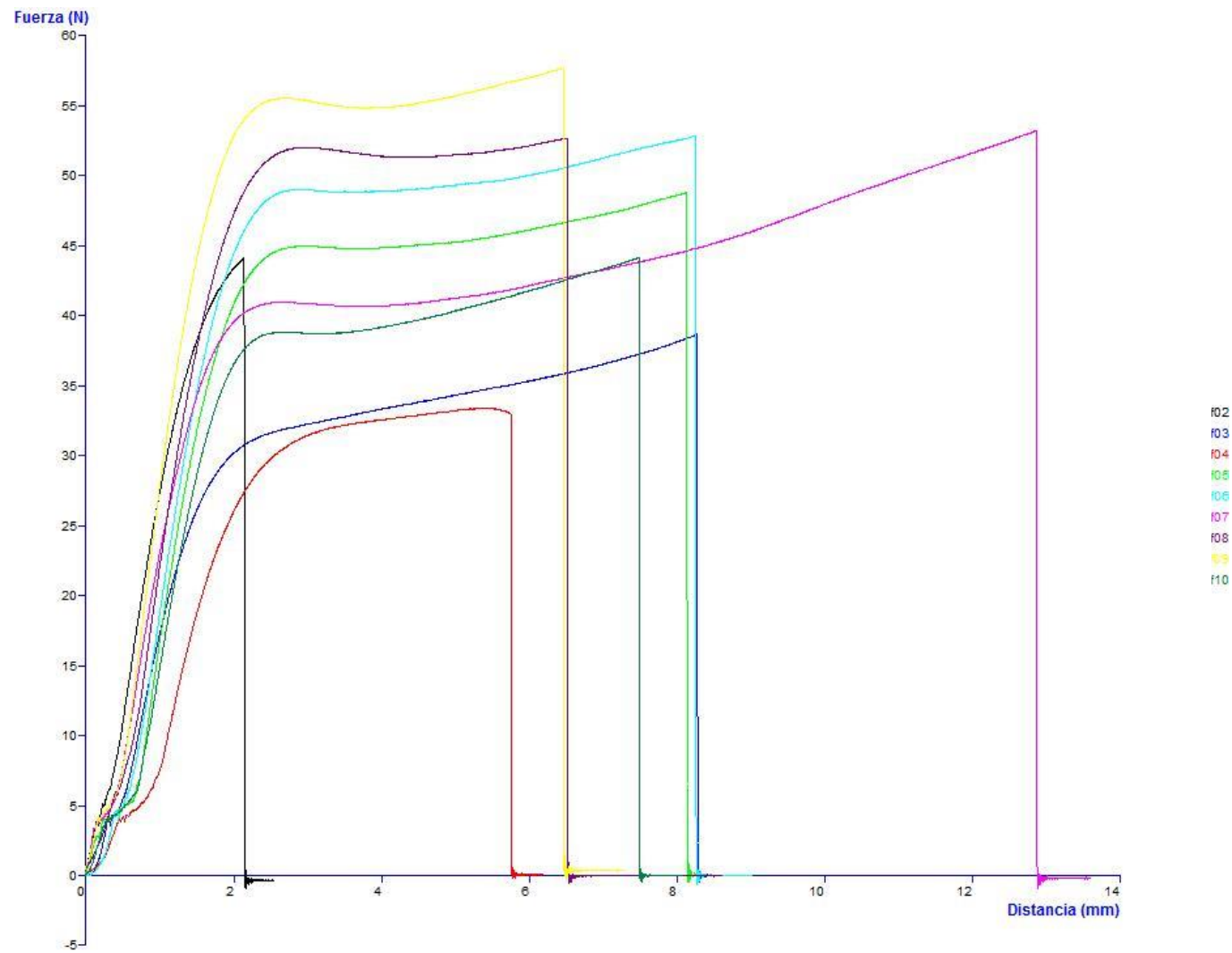


Figura 29. Representación gráfica del ensayo de tracción de la formulación de Quitosano + 1,5% NWQ

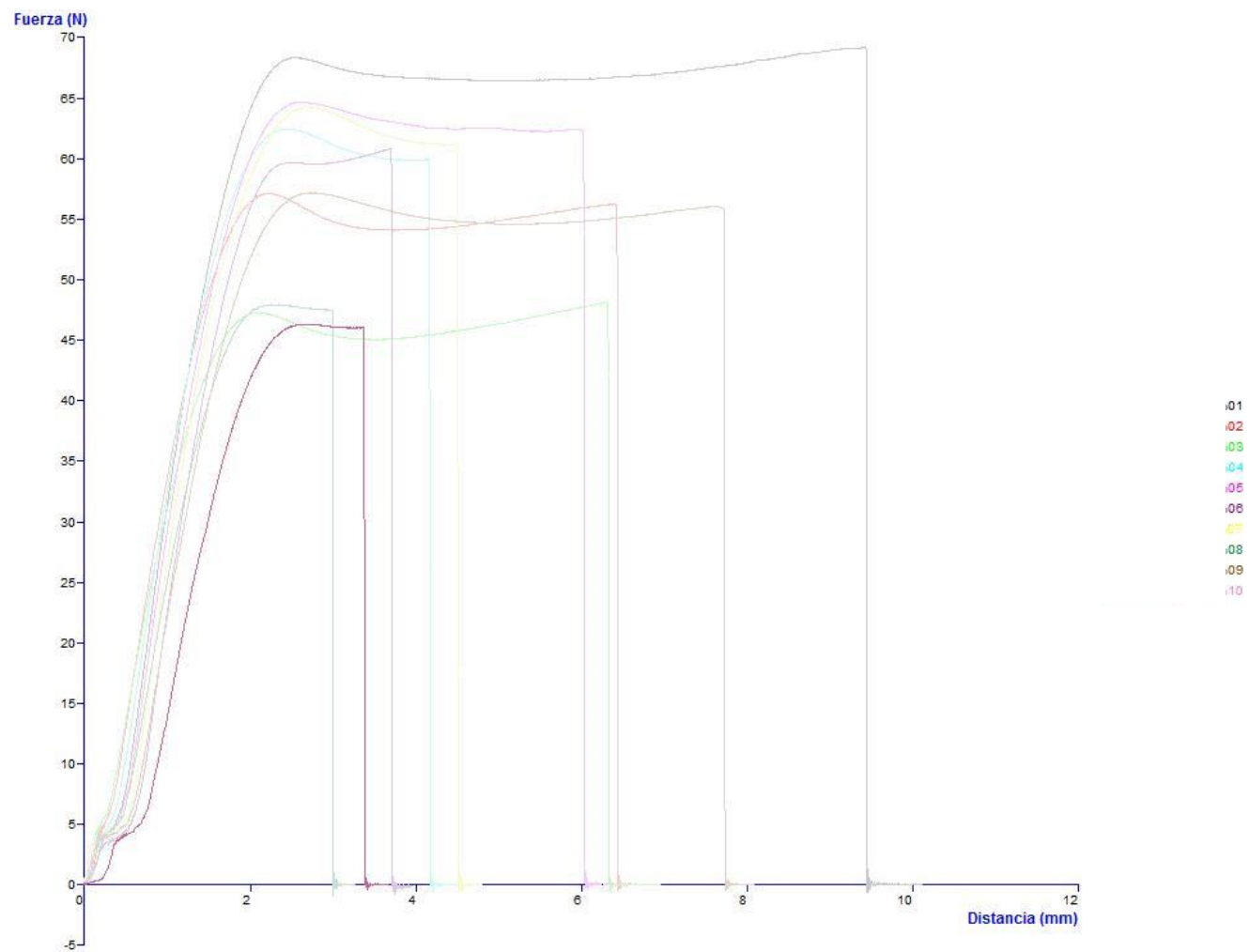


Figura 30. Representación gráfica del ensayo de tracción de la formulación de Quitosano+ 3% NWQ

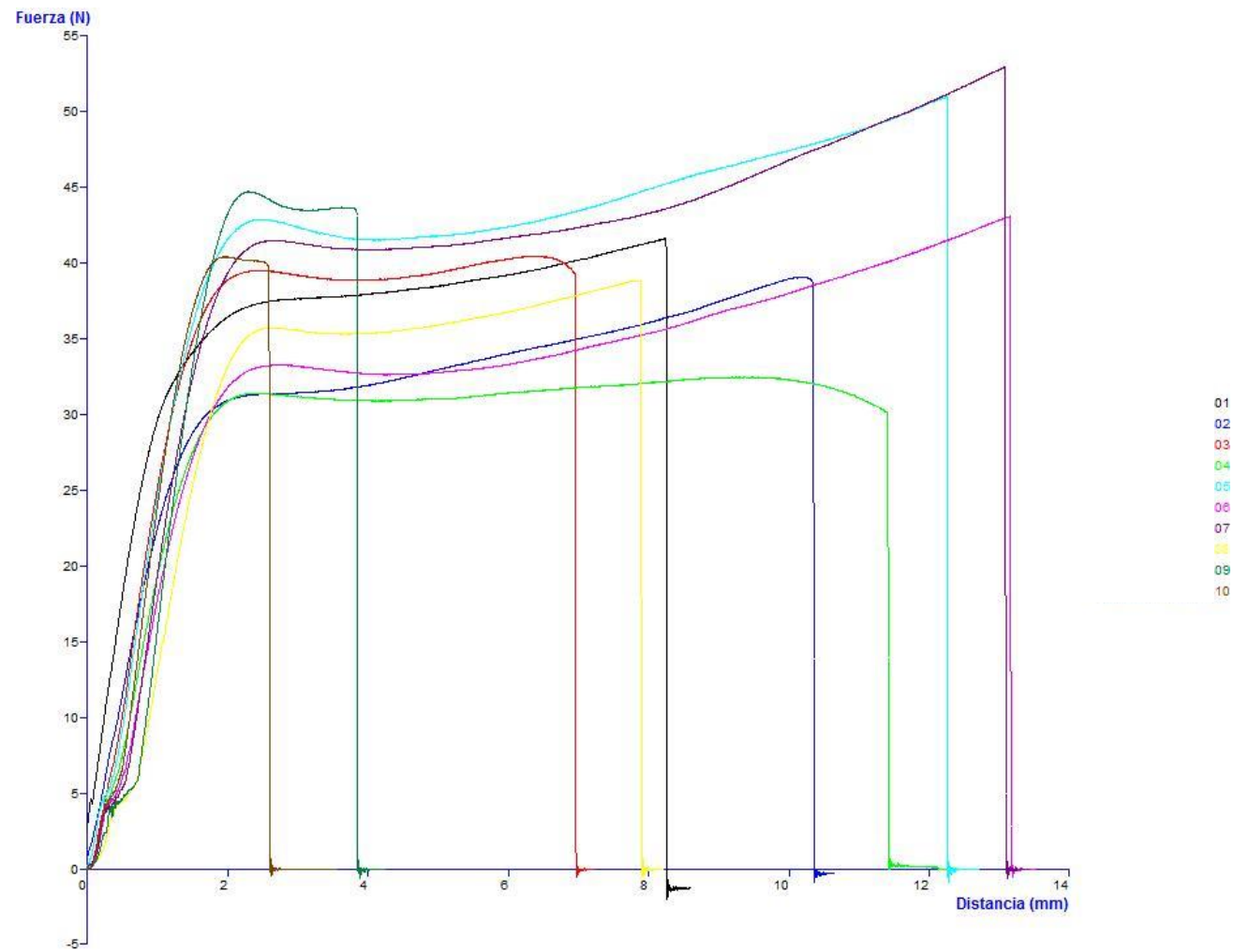


Figura 31. Representación gráfica del ensayo de tracción de la formulación de Quitosano + Carvacrol

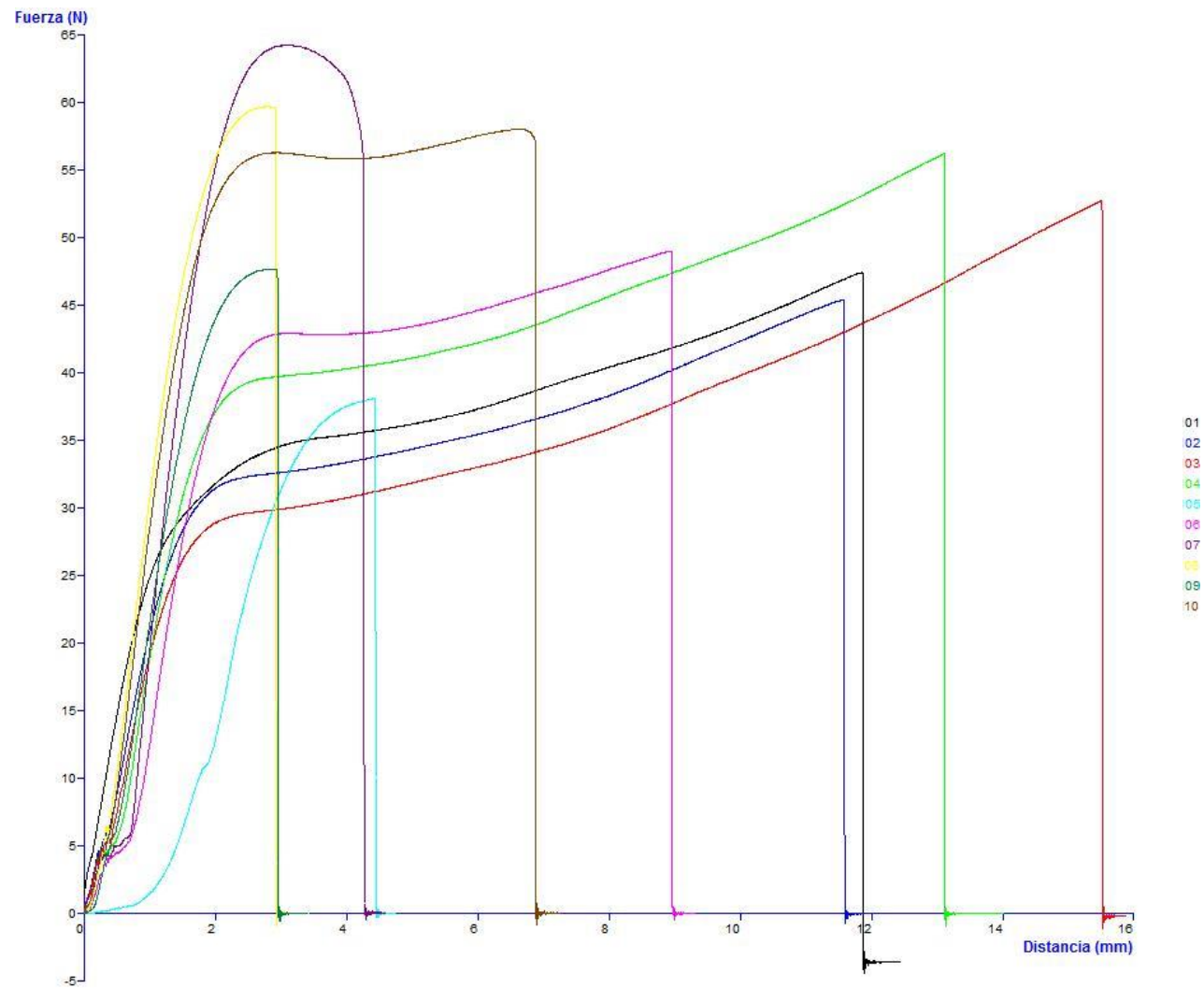


Figura 32. Representación gráfica del ensayo de tracción de la formulación de Quitosano + 1,5% NWQ + Carvacrol

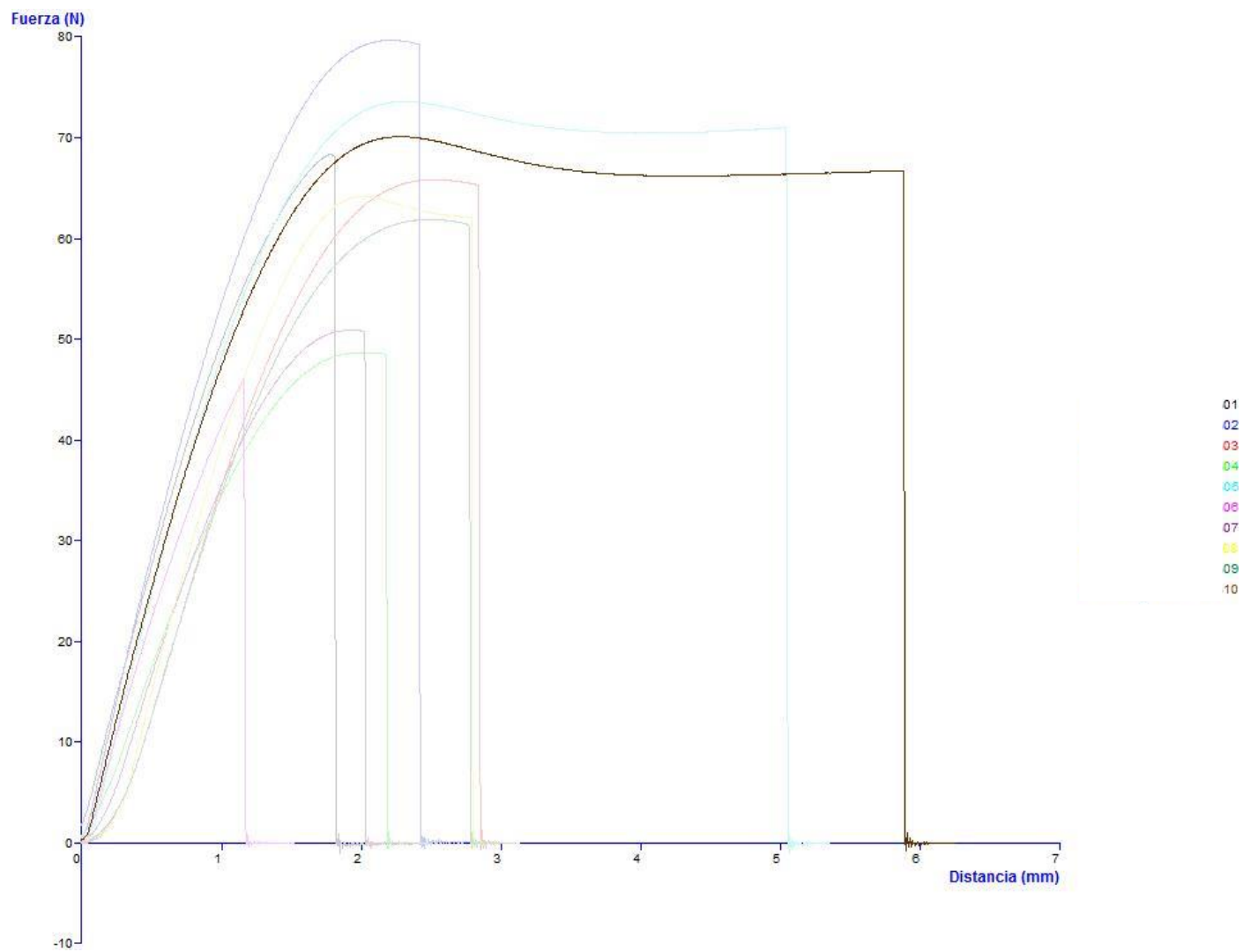


Figura 33. Representación gráfica del ensayo de tracción de la formulación de Quitosano + 3% NWQ + Carvacrol